

**Untersuchungen zur Rolle der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
und des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms in der filamentösen Phaeophyceae  
*Ectocarpus siliculosus***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sylvia Busch**  
geboren in Wehrda

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 10.11.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. P. Galland  
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung am 21.11.2003

meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Busch, S. und Schmid, R. (2001).

Enzymes associated with  $\beta$ -carboxylation in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae): Are they involved in net carbon acquisition?

European Journal of Phycology 36: 61-70



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Verfügbarkeit von CO <sub>2</sub> für die Photosynthese.....	1
1.2 C <sub>i</sub> -Akquisition bei marinen Makroalgen.....	2
1.3 C <sub>4</sub> -Syndrom bei Diatomeen .....	4
1.4 Die Braunalge <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	5
1.5 Blaulichtstimulation der Photosynthese von <i>E. siliculosus</i> .....	7
1.6 Einfluß der C <sub>i</sub> -Konzentration auf die Blaulichtstimulation bei <i>E. siliculosus</i> .....	8
1.7 Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase.....	10
1.7.1 Physiologische Rolle der PEPCK in Algen .....	12
1.7.2 Die Rolle der PEPCK.....	13
1.8 Das NADP <sup>+</sup> -Malat-Enzym.....	14
1.9 Zielsetzung.....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Arbeitsmaterialien.....	18
2.1.1 Organismen.....	18
2.1.2 Chemikalien .....	18
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.4 Enzyme und Inhibitoren.....	23
2.1.5 Molekularbiologische Kits.....	23
2.1.6 DNA-/RNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtstandards.....	23
2.1.7 Antikörper .....	24
2.1.8 Chromatographie-Matrizes und -Säulen .....	24
2.1.9 Membranen, Filter, Konzentratoren.....	25
2.1.10Geräte.....	25
2.2 Organismen und Kultivierung.....	27
2.2.1 Algenkultur .....	27
2.2.1.1 Kulturbedingungen .....	27
2.2.1.2 Sonstiges Pflanzenmaterial .....	28
2.3 Enzymextraktionen .....	29
2.3.1 Extraktion von PEPCK und Malat-Enzym aus <i>E. siliculosus</i> .....	29
2.3.2 Enzymextraktion aus Maisblättern .....	29
2.3.3 Herstellung eines Rohextraktes aus Spinatblättern .....	30
2.3.4 Enzymextraktion aus <i>Kalanchoë</i> -Blättern .....	30
2.4 Ammoniumsulfatpräzipitation .....	30
2.5 Enzymreinigung.....	31
2.5.1 Reinigung von PEPCK aus <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	31
2.5.2 Reinigung von NADP <sup>+</sup> -Malat-Enzym aus <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	31
2.6 Molekulargewichtsbestimmung nativer Proteine .....	32

2.7 Protein-Bestimmung .....	32
2.8 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	33
2.8.1 Anfärben von SDS-Polyacrylamidgelen .....	34
2.8.1.1 Färbung mit Coomassie Blue R-250 .....	34
2.8.1.2 Silberfärbung .....	34
2.9 Bestimmung enzymatischer Aktivitäten .....	35
2.9.1 PEPCK (EC 4.1.1.49) .....	35
2.9.2 NADP <sup>+</sup> -Malat-Enzym (EC 4.1.1.40) .....	36
2.10 Western-Blotting .....	36
2.10.1 Färbung von Proteinen auf Blot-Membranen (mit Ponceau S) .....	37
2.11 Protein Sequenzierung .....	37
2.11.1 Vorbereitung der Proteine für die Sequenzierung .....	38
2.12 Immunchemischer Nachweis von Antigenen auf Blot-Membranen .....	38
2.12.1 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen .....	38
2.12.2 Binden des Primärantikörpers .....	39
2.12.3 Binden des Sekundärantikörpers .....	39
2.12.4 Detektion der Immunkomplexe auf der Blot-Membran .....	40
2.13 Antikörperproduktion .....	40
2.14 Reinigung der IgG-Fraktion eines polyklonalen Antikörperserums .....	41
2.15 Immunchemische Assays .....	42
2.16 Immunocytochemische Lokalisation verschiedener Proteine in <i>Ectocarpus siliculosus</i> und <i>Pylaiella littoralis</i> .....	43
2.16.1 Fixierung der Zellen .....	43
2.16.2 Aufbrechen der Zellen .....	43
2.16.3 Inkubation mit primärem Antikörper .....	44
2.16.4 Inkubation mit sekundärem Antikörper .....	44
2.16.5 Einbettung der Zellen .....	44
2.16.6 Herstellung des Einbettungsmediums .....	45
2.17 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie .....	45
2.18 Nachweis acider Kompartimente mit Oregon Green <sup>®</sup> 488 Carbonsäure .....	46
2.19 Isolierung von Nukleinsäuren .....	46
2.19.1 Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNA .....	46
2.19.2 Isolierung von Poly-A <sup>+</sup> -mRNA .....	48
2.19.3 Plasmid-DNA-Minipräparation .....	48
2.20 Konzentrations-, Grössen- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	49
2.20.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie .....	49
2.20.2 Mengen und Größenbestimmung im Agarosegel .....	49
2.21 Verdau mit Restriktionsenzymen .....	50
2.22 Elektrophorese von Nukleinsäuren .....	50
2.22.1 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese von DNA .....	50
2.22.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA .....	50
2.23 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	51
2.24 3'-RACE-PCR-Amplifikation .....	51
2.24.1 cDNA-Erststrangsynthese .....	52

2.24.2	3'-RACE-PCR.....	52
2.24.2.1	Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen ("Primerdesign").....	53
2.25	Klonierung von PCR-Produkten.....	53
2.25.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	54
2.26	DNA-Sequenzierung.....	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
3.1	Reinigung von Enzymen aus <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	56
3.1.1	Reinigung von PEPCK .....	56
3.1.2	Reinigung des NADP <sup>+</sup> -Malat-Enzyms .....	59
3.2	Enzymkinetische Charakterisierung .....	61
3.2.1	Substratabhängigkeiten.....	61
3.2.2	Hemmung der PEPCK durch 3-Mercaptopikolinsäure.....	65
3.3	Immunchemische Nachweise.....	66
3.3.1	Western-Blotting und Immun-Färbung mit Antiseren aus höheren Pflanzen.....	66
3.3.2	Antikörper gegen PEPCK und ME aus <i>E. siliculosus</i> .....	69
3.3.2.1	IgG-Reinigung .....	69
3.3.2.2	Immunpräzipitation / Immuninhibition .....	70
3.3.2.3	Western-Blotting und Immun-Färbung .....	71
3.4	Intrazelluläre Lokalisation .....	73
3.4.1	Wahl der Fixierungsbedingungen.....	73
3.4.2	Lokalisation von Rubisco und PEPCK in <i>Ectocarpus siliculosus</i> -Zellen .....	75
3.4.3	Immunlokalisation von PEPCK und Rubisco nach Anzucht im Schwachlicht .....	77
3.5	Immunlokalisationsversuche von Tubulin, PEPCK und Rubisco in der Braunalge <i>Pylaiella littoralis</i> .....	78
3.6	Lokalisation acider Kompartimente in <i>E. siliculosus</i> -Zellen.....	80
3.7	Proteinsequenzierung.....	81
3.8	RNA-Isolierung aus <i>Ectocarpus siliculosus</i> .....	81
3.9	3'-RACE-PCR.....	82
3.10	Klonierung und Sequenzierung des 3'-RACE-PCR-Produktes von GSP P62.....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1	Funktion des NADP <sup>+</sup> -Malat-Enzyms .....	87
4.2	Funktion der PEPCK.....	92
4.3	Immunologische Verwandtschaft der PEPCK.....	97
4.4	Molekularbiologische Untersuchungen .....	99
4.5	Enzym-Lokalisation.....	100
4.6	Ist der Pyrenoid ein Teil des CCM?.....	104
4.7	Die Rolle der PEPCK in <i>E. siliculosus</i> .....	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure bzw. Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCM	Kohlenstoff-Konzentrierungsmechanismus
CDF	Carboxy-Difluorfluorescein
CDFDA	Carboxy-Difluorfluorescein-Diacetat
cDNA	copy-DNA
C <sub>i</sub>	anorganischer Kohlenstoff ( <i>inorganic carbon</i> )
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1'-dimethyl-Harnstoff
DIC	<i>dissolved inorganic carbon</i>
DNA	Desoxynukleinsäure
DOC	Desoxycholat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanosin
GSP	genspezifischer Primer
GTE	Glucose-Tris-EDTA
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
I	Inosin
Da	Dalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
MDH	Malat-Dehydrogenase
ME	Malat-Enzym
min	Minute
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

MPS	Mercaptopikolinsäure
M <sub>r</sub>	relative molekulare Masse
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
NBT	Nitroblautetrazolium
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NTP	Nucleosidtriphosphat
OAA	Oxalacetat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PES	Provasolis' enriched seawater medium
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
Rubisco	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SMART	<i>switching mechanism at 5' end of RNA transcripts</i>
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
V	Volumen
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> für die Photosynthese

Untersuchungen fossiler Cyanobakterien-Funde führten zu der Vermutung, dass bereits vor ca. 3,5 Milliarden Jahren prokaryotische Organismen mit der Fähigkeit zu oxygener Photosynthese auf der Erde existierten (CATLING et al. 2001; BRASIER et al., 2002; SCHOPF et al., 2002; konträr dazu: SUMMONS et al., 1999). Proteinvergleiche bei rezenten Cyanobakterien lassen darauf schließen, dass die Ribulose-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (Rubisco; EC 4.1.1.39), das Schlüsselenzym der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation, damals bereits katalytisch aktiv vorlag (RAVEN, 1997a; b); umgeben von einer vorherrschend reduzierenden Erdatmosphäre, in der der Sauerstoff als Substrat zur Ausbildung einer signifikanten Oxygenase-Aktivität der Rubisco fehlte. Dabei ist davon auszugehen, dass die Carboxylase-Aktivität der Rubisco aufgrund der im Vergleich zu heute vermutlich 100-fach höheren CO<sub>2</sub>-Konzentration der Atmosphäre im Sättigungsbereich lag (RAVEN, 1997c).

In der rezenten Erdatmosphäre beträgt die CO<sub>2</sub>-Konzentration nur noch etwa 0,035 Volumenprozent. Molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) liegt hingegen zu 21% vor, so dass beide Substrate um das aktive Zentrum der Rubisco konkurrieren und eine Oxygenase-Aktivität unter diesen Umständen unvermeidlich ist (EDWARDS und WALKER, 1983).

Etwa 15% der terrestrischen Pflanzen zeigen - vermutlich als Anpassung an die geringe CO<sub>2</sub>-Konzentration der Atmosphäre - spezifische Mechanismen (CAM, C<sub>4</sub>), die die Wirkung des O<sub>2</sub> auf die Rubisco überwinden, indem die CO<sub>2</sub>-Konzentration in unmittelbarer Nähe des Enzyms erhöht und folglich die Photorespiration unterdrückt wird (SAGE, 2001).

Im Gegensatz zu terrestrischen Pflanzen stehen aquatische photoautotrophe Organismen generell vor dem Problem einer vergleichsweise geringen Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> für die Photosynthese. Zwar ist die Konzentration der im Wasser gelösten anorganischen Kohlenstoffverbindungen (CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) mit etwa 2 bis 2,3 mmol pro Liter (im Gleichgewicht mit Luft, bei 15°C) und einem für Seewasser üblichen pH-Bereich zwischen 7.8 bis 8.2 relativ hoch (MADSEN und SAND-JENSEN, 1991), jedoch liegt das Dissoziationsgleichgewicht unter diesen Bedingungen stark auf der Seite der ionischen C<sub>i</sub> (anorganischer Kohlenstoff)-Spezies. Bei pH 8.2 liegen 91% des DIC (*dissolved inorganic carbon*) als Hydrogencarbonat vor (FORSTER und DRING, 1992). Die Konzentration des gelösten CO<sub>2</sub> beträgt, mit einem DIC-Anteil von 0,5-1%, hingegen lediglich ca. 10-15 mM (RIEBESELL et al., 1993). Sie entspricht damit dem Anteil von CO<sub>2</sub>, der

in der Luft vorkommt, verringert sich aber mit abnehmender Wassertemperatur (BEARDALL und ROBERTS, 1999). Dem gegenüber steht eine  $O_2$ -Konzentration in Seewasser von ungefähr 250 mM (FALKOWSKI und RAVEN, 1997).

Als Substrat für die Rubisco dient ausschließlich  $CO_2$  (RAVEN, 1970). Während ein Teil mariner Pflanzen neben  $CO_2$  zusätzlich  $HCO_3^-$  photosynthetisch nutzt, ist kein Beispiel einer direkten  $CO_3^{2-}$ -Nutzung bei marinen photoautotrophen Organismen bekannt (BOWES, 1987; MARBERLY, 1992).

Anders als  $CO_2$  und  $H_2CO_3$  können ionische  $C_i$ -Spezies nicht durch Zellmembranen diffundieren (GUTKNECHT et al., 1977). Die nicht katalysierte Umwandlung von Hydrogencarbonat zu Kohlendioxid verläuft zudem so langsam, dass bei photosynthetischer Aktivität der Pflanze keine ausreichend schnelle  $CO_2$ -Nachlieferung erfolgen kann (BADGER, 1987).

Ein entscheidender Faktor, der die Verfügbarkeit von  $CO_2$  in aquatischen Systemen beeinflusst, ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen, die im Wasser 10000-fach geringer als in Luft ist (RAVEN et al., 1985; LEEGOOD, 2002). Außerdem können unbewegte Grenzschichten an der Pflanzenoberfläche auftreten, die (besonders bei geringer Fließgeschwindigkeit) bei größeren Wasserpflanzen auf bis zu 500  $\mu m$  anwachsen können und damit dicker sind, als die entsprechenden Grenzschichten in Luft (SAND-JENSEN et al., 1985; GONEN et al. 1995).

## 1.2 $C_i$ -Akquisition bei marinen Makroalgen

Trotz eingeschränkter  $CO_2$ -Verfügbarkeit in aquatischen Ökosystemen tragen marine photoautotrophe Organismen mit bis zu  $50 \times 10^{15}$  g fixiertem Kohlenstoff pro Jahr beinahe zur Hälfte der Primärproduktion der Erde bei (RAVEN, 1997d); ein Anteil von 12% entfällt davon auf marine Makroalgen (RAVEN, 1997d).

Viele marine Makroalgen zeigen Charakteristika, die man von  $C_4$ -Pflanzen kennt. Sie zeichnen sich durch einen niedrigen,  $O_2$ -unempfindlichen  $CO_2$ -Kompensationspunkt sowie einen hohen pH-Kompensationspunkt aus (COLMAN, 1984; JOHNSTON und RAVEN, 1986). Geringe Photorespirationsraten und photosynthetische  $O_2$ -Insensitivität sind weit verbreitet (REISKIND et al., 1989).

Aufgrund dieser Merkmale sowie der hohen  $CO_2$ -Fixierungsrate wurde vermutet, dass marine Makroalgen über Mechanismen einer aktiven  $C_i$ -Akkumulation verfügen (RAVEN, 1997d).

Tatsächlich ist seit längerem bekannt, dass marine Makroalgen die Fähigkeit besitzen,  $HCO_3^-$ , dessen Konzentration in natürlichem Seewasser weit über der von  $CO_2$  liegt, als externe  $C_i$ -Quelle für die Photosynthese zu nutzen (JOLLIFFE und TREGUNNA, 1970; SURIF und RAVEN,

1989; LARSSON und AXELSSON, 1999). Einige von ihnen decken auf diese Art sogar bis zu 98% ihrer Gesamtkohlenstoff-Aufnahme (SAND-JENSEN und GORDON, 1984). Da Hydrogencarbonat-Anionen Zellmembranen nicht mittels Diffusion passieren können, müssen entsprechende Transportmechanismen vorausgesetzt werden. Ein solches  $\text{HCO}_3^-$ -transportierendes Anionenaustauscherprotein, welches denen von Erythrocyten ähnelt, konnte beispielsweise für *Ulva lactuca* sowie die Rotalge *Gracilaria gaditana* nachgewiesen werden (DRECHSLER und BEER, 1991; ANDRÍA et al., 1999).

Eine weitere - meist zusätzliche - Möglichkeit der Limitierung der Photosynthese aufgrund der geringen Verfügbarkeit von  $\text{CO}_2$  in aquatischen Systemen entgegenzuwirken, stellt die Akquisition von  $\text{C}_i$  unter Einsatz von Carboanhydrasen (CA) dar. Für *Ulva rigida* und *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta), *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) und *Gracillaria tenuistipitata*, *Chondrus crispus* sowie *Bostrychia scorpioides* (Rhodophyta) konnten extrazelluläre Carboanhydrasen nachgewiesen werden, die die Dehydrierung von  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  an der Außenseite der Zellmembran katalysieren (siehe auch GIORDANO und MARBERLY, 1989). Das dabei entstehende  $\text{CO}_2$  kann anschließend (im Gegensatz zu  $\text{HCO}_3^-$ ) durch Diffusion in die Zelle gelangen und so zur Erhöhung der Photosyntheserate beitragen (COLMAN, 1991; BJÖRK et al., 1992; HAGLUND et al., 1992; LARSSON et al., 1997; MERCADO und NIELL, 1999). Für *Laminaria saccharina* zeigten AXELSSON et al. (2000), dass durch die Gabe von Acetazolamid (Inhibitor extrazellulärer Carboanhydrasen) und Protonen-Puffern die  $\text{HCO}_3^-$ -Nutzung der Alge fast vollständig gehemmt werden kann. Sie postulierten, dass durch einen aktiven Transport von Protonen nach außen in unmittelbare Nähe externer Carboanhydrasen die Dehydrierung von  $\text{HCO}_3^-$  gefördert, und so die Verfügbarkeit von  $\text{CO}_2$  für die Photosynthese erhöht wird. Anhand nachfolgender Inhibitionsstudien wurde ein vergleichbarer Mechanismus unter Beteiligung einer periplasmatischen Carboanhydrase sowie einer Protonen-Pumpe (P-Typ  $\text{H}^+$ -ATPase) für die Rotalge *Coccolytus truncatus* vorgeschlagen (SNOEIJIS et al., 2002). Eine weitere Variante der  $\text{C}_i$ -Akquisition wurde durch den Nachweis sowohl einer externen Carboanhydrase als auch eines membrangebundenen  $\text{HCO}_3^-$ -Transportproteins bei der Rotalge *Eucheuma denticulatum* aufgedeckt (GRANBOM und PEDERSÉN, 1999).

Die meisten marinen Makroalgen zeigen auch Aktivitäten intrazellulärer Carboanhydrasen (GIORDANO und MARBERLY, 1989), die im Cytoplasma gelöst oder mit der Chloroplastenmembran assoziiert nachgewiesen werden konnten (BJÖRK et al., 1992; HAGLUND et al., 1992). Diese katalysieren u.a. die Umwandlung von aktiv in die Zelle aufgenommenem Hydrogencarbonat, welches für die Rubisco zu  $\text{CO}_2$  umgewandelt werden muß.



Neben den Mechanismen zur Nutzung von Hydrogencarbonat konnten für einige andere Algen Charakteristika eines C<sub>4</sub>-Metabolismus nachgewiesen werden.

Für *Udotea flabellum* (Chlorophyta) wurde neben den zu Anfang erwähnten Eigenschaften typischer C<sub>4</sub>-Pflanzen eine der Rubisco äquivalente Aktivität von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) gezeigt. Durch Einsatz von 3-Mercaptopikolin-Säure (spezifischer Inhibitor der PEPCK) wurde die Photosyntheserate um 70% reduziert und deutlich empfindlicher für Sauerstoff. Außerdem registrierte man bei Malat und Apartat als früh markierten Photosyntheseprodukten eine Abnahme um 66% während die Konzentration der Intermediate des Glycolatweges um das dreifache anstiegen. Wegen geringer Dunkelfixierungsraten konnte das Vorliegen eines CAM-Stoffwechsels ausgeschlossen werden (REISKIND et al. 1988; REISKIND und BOWES, 1991). Aufgrund der Lokalisation der Rubisco in den Chloroplasten und der PEPCK im Cytosol wurde auf eine den terrestrischen C<sub>4</sub>-Pflanzen vergleichbare Form der Photosynthese geschlossen.

In früheren Untersuchungen an marinen Braunalgen wurden - parallel zu stark ausgeprägten PEPCK-Aktivitäten - hohe Raten lichtunabhängiger CO<sub>2</sub>-Fixierung nachgewiesen (KERBY und Evans, 1983b) und die Existenz eines C<sub>4</sub>-Metabolismus vermutet. Dieser Interpretation wurde hingegen für *Laminaria*- und *Fucus*-Arten aufgrund einer direkten Korrelation zwischen Mannitol-Abbau und nichtphotosynthetischer CO<sub>2</sub>-Fixierung widersprochen (KREMER, 1981a). Der PEPCK wurde eine primär anaplerotische Funktion zugewiesen.

Aufgrund der Fähigkeit von *Fucus vesiculosus* sowohl in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser als auch in CO<sub>2</sub>-freier Luft die Photosynthese für einen Zeitraum von ungefähr zwei Stunden aufrecht zu erhalten wurde auf das Vorliegen sowohl eines anorganischen als auch eines organischen Kohlenstoffspeichers geschlossen. Dabei wurde die Fixierung von CO<sub>2</sub> in den organischen Pool im Licht als C<sub>4</sub>-ähnlicher Vorgang interpretiert, während das langsame Entlassen des CO<sub>2</sub> aus dem Speicher als CAM-Merkmal eingestuft wurde (KAWAMITSU und BOYER, 1999).

### 1.3 C<sub>4</sub>-Syndrom bei Diatomeen

Wie andere Phytoplankton bildende Klassen scheinen auch Diatomeen (Bacillariophyceae) in der Regel ihren CO<sub>2</sub>-Bedarf auf dem "klassischen" Weg eines - wenn auch bis dato biochemisch weitgehend unaufgeklärten - CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus zu decken (RAVEN, 1997e). So konnte mit Hilfe der <sup>14</sup>C-Silikonöl-Zentrifugationstechnik der Nachweis eines Kohlenstoff-Konzentrierungsmechanismus (CCM) u. a. für *Phaeodactylum tricornutum* (JOHNSTON und

RAVEN, 1996) und *Skeletonema costatum* (COLMAN und ROTATORE, 1995) erbracht werden. FIELDING et al. (1998) zeigten, dass in *Thalassiosira pseudonana* ein CCM durch geringe DIC-Konzentrationen im Außenmedium induziert wird. REINFELDER et al. (2000; siehe auch RIEBESELL, 2000) postulierten einen C<sub>4</sub>-Photosynthese-Weg für die marine Diatomee *Thalassiosira weissflogii*.

Für die Ausführung möglicher Carboxylierungs- bzw. Decarboxylierungsreaktionen machten sie sowohl eine Phosphoenolcarboxylase (PEPC)- als auch eine PEPCK-Aktivität für unter CO<sub>2</sub>- und Zn-armen (Carboanhydrasen katalysieren zinkabhängig die Umwandlung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in CO<sub>2</sub>) Bedingungen angezogenen Zellen verantwortlich. Weiterhin ergab sich aus <sup>14</sup>C-Kurzzeitmarkierungsexperimenten Malat als erstes Markierungsprodukt (nach fünf Sekunden) und in weiterführenden *pulse-chase*-Experimenten der Transfer von <sup>14</sup>C hauptsächlich zu 3-Phosphoglycerinsäure und Zuckern. Aus diesen Befunden schlußfolgerten REINFELDER et al., dass der überwiegende Anteil der CO<sub>2</sub>-Assimilation bei CO<sub>2</sub>- oder Zn-gestressten Zellen von *Thalassiosira weissflogii* über einen C<sub>4</sub>-Photosynthese-Weg abgedeckt wird.

Unter anderem aufgrund von Beobachtungen, die für *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) gemacht wurden (JOHNSTON und RAVEN, 1987), wo trotz signifikanter <sup>14</sup>C-Markierung von C<sub>4</sub>-Verbindungen (unter Seewasserbedingungen) das erste <sup>14</sup>C-Einbauprodukt (nach ein bis drei Sekunden) Phosphoglycerat und nicht Malat war, sowie der Tatsache, dass die PEPCK als Decarboxylierungsenzym, zumindest bei C<sub>4</sub>-Pflanzen, Aspartat gegenüber Malat als Substrat bevorzugt (SAGE und MONSON, 1999), erachteten JOHNSTON et al. (2001) die Schlußfolgerung des Vorliegens eines C<sub>4</sub>-Weges von RIEBESELL et al. (aufgrund unzureichender Beweisführung) jedoch als verfrüht.

## 1.4 Die Braunalge *Ectocarpus siliculosus*

Unabhängig von den dargelegten Strategien verschiedener Algen einer CO<sub>2</sub>-Limitierung der Photosynthese unter Wasser entgegenzuwirken konnte für alle dahingehend untersuchten Arten der Phaeophyceen gezeigt werden, dass die mit Rotlicht saturierte Photosynthese mit Blaulicht zusätzlich stimuliert werden kann (FORSTER und DRING, 1994; SCHMID et al., 1994). Aufgrund entsprechender Charakteristika wurde auch dieses Phänomen zunächst mit dem Vorliegen eines C<sub>4</sub>-Metabolismus erklärt (Schmid und Dring, 1996a). Als Modellorganismus zur Klärung der Ursache des Phänomens wurde als Vertreter niederer Phaeophyceen *Ectocarpus siliculosus*

gewählt. Diese Alge und ihre der oben angeführten Hypothese zugrundeliegenden physiologischen Eigenschaften sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Die filamentöse Braunalge *Ectocarpus siliculosus* gehört der Ordnung der Ectocarpales und damit der anatomisch einfachsten Ordnung der Phaeophyceen an.

Die in Form haariger Büschel angeordneten gelbbraunen Zellfäden sind vorwiegend im sublitoralen Bereich von Küsten, aber auch in Gezeitentümpeln oder epiphytisch auf Makroalgen wie beispielsweise *Fucus serratus* oder *Chondrus crispus* anzutreffen. Die kosmopolitische Verbreitung dieser Art reicht von der Arktis (LEE, 1980) über Nordeuropa und das Mittelmeer, Island, Grönland und die Nordamerikanische Küste bis nach Australien und Neuseeland (MÜLLER, 1979). Die einfachen Zellfäden der Alge wachsen durch Apikalzellteilung; Verzweigungen erfolgen aufgrund diffuser, interkalärer Zellteilungen, wodurch keine deutlich hervortretende Hauptachse - als Unterscheidungsmerkmal zu *E. fasciculatus* - ausgebildet wird (RUSSEL, 1966; LÜNING, 1985).

**Abb. 1.1:** Zellfäden (oben) und Ausschnitt eines Zellfadens von *E. siliculosus* (aus der Kultur Es PAR 1027, Sp.); Zellen mit Chloroplasten und Pyrenoiden

Die im Durchschnitt ca. 10×40 µm großen Zellen enthalten bandförmige, z.T. gelappte Chloroplasten mit denen zahlreiche deutlich hervortretende Pyrenoide assoziiert sind.

Wie viele andere Braunalgen bildet auch *E. siliculosus* Physoden - mit Polyphenolen angereicherte Vakuolen - aus.

Der Lebenszyklus dieser Art ist schwach hetero-, nahezu isomorph diplohaplontisch. Während auf den Sporophyten apical die Zoiden-bildenden, plurilokulären und / oder unilokulären

Zoidangien (temperaturabhängig) entstehen, bilden weibliche und männliche Gametophyten nur plurilokuläre Gametangien aus. Sie gleichen den plurilokulären Sporangien morphologisch (MÜLLER, 1979).

## 1.5 Blaulichtstimulation der Photosynthese von *E. siliculosus*

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung von *E. siliculosus* zeigt unter sättigender RL-Bestrahlung eine ausgeprägte circadiane Rhythmik. Die Periodenlänge des freilaufenden Rhythmus beträgt ca. 23 Stunden mit einem Maximum um die Mittagszeit. Mit einer Phasenverschiebung von ca. fünf Stunden zeigt auch der CO<sub>2</sub>-Verbrauch diese Rhythmik (Schmid und Dring, 1992).

**Abb. 1.2:** Circadiane O<sub>2</sub>-Entwicklung und CO<sub>2</sub>-Aufnahme von *E. siliculosus* unter saturierendem Dauer-RL (46 W m<sup>-2</sup>). Zusätzliche 2-minütige BL-Pulse sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Den Beginn und das Ende der RL-Bestrahlung zeigen Pfeilspitzen an. (aus: Schmid und Dring, 1992)

Wie in Abb. 1.2 dargestellt, ist es möglich, die im Rotlicht saturierte Photosynthese von *E. siliculosus* durch einen kurzen BL-Puls vorübergehend zu stimulieren. Das Ausmaß der Stimulation ist dabei von der Phase der Rhythmik abhängig, in der der BL-Puls gegeben wird. Befindet sich die Photosyntheserate im Bereich des Maximums der circadianen Rhythmik, so erfolgt nur eine geringe Stimulation. Wird hingegen ein Puls im Tal der Rhythmik gegeben, so ist die Stimulation hoch (SCHMID und DRING, 1992; SCHMID et al., 1994).

Aufgrund dieser kompensatorischen Blaulichtwirkung ist in Gegenwart von Dauerblaulicht - also auch im Weißlicht - keine klare circadiane Rhythmik nachweisbar.

Die Stimulation der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung erfolgt bereits 5 Sekunden nach Gabe von BL. Zwar wurde noch kein Aktionsspektrum für die Stimulation der Photosynthese für *E. siliculosus* erstellt, aber entsprechende Spektren existieren für *Laminaria saccharina* und *Laminaria digitata*, die beide ähnliche BL-Stimulationen wie *Ectocarpus* zeigen. Aus diesen ergibt sich ein für BL-Rezeptoren typisches Aktionsspektrum mit einem Maximum bei 460 nm, einem Minimum im Bereich von 430 nm und keinerlei Wirkung oberhalb von 520 nm (DRING, 1989; SCHMID und DRING, 1993b).

## 1.6 Einfluß der $C_i$ -Konzentration auf die Blaulichtstimulation bei *E. siliculosus*

Im normalen Seewasser unterliegt die Photosynthese von *Ectocarpus* unter saturierenden RL-Bedingungen einer Limitierung durch  $C_i$ . Auf eine Erhöhung der DIC-Konzentration des umgebenden Wassers reagiert die Alge mit einer Steigerung ihrer Photosyntheserate. Das Ausmaß der Stimulation der  $O_2$ -Entwicklung durch BL nimmt dabei mit steigender  $C_i$ -Konzentration ab (FORSTER und DRING, 1992).

Der gleiche Effekt erfolgt durch eine Erniedrigung des pH-Wertes des Seewassers, wodurch das  $C_i$ -Dissoziationsgleichgewicht auf die Seite des  $CO_2$  verlagert wird. Unter diesen Bedingungen ist das Ausmaß einer BL-Stimulation der Photosynthese annähernd invers proportional zum Logarithmus der freien  $CO_2$ -Konzentration im Medium (SCHMID und DRING, 1996a; SCHMID et al., 1996).

Sehr niedrige, die Photosynthese stark limitierende DIC-Konzentrationen ( $\leq 0,5$  mol/l) bewirken davon abweichend eine Verminderung der Amplitude der circadianen Rhythmik sowie eine veränderte Kinetik der BL-Stimulation (SCHMID und DRING, 1996a; siehe auch SCHMID, 1998). Trotzdem unterliegt unter solchen Bedingungen das Ausmaß der BL-Stimulation einer klaren circadianen Rhythmik.

Selbst in  $C_i$ -freiem Seewasser konnte die durch BL induzierte Stimulation der Photosynthese mit den oben beschriebenen Charakteristika nachgewiesen werden (SCHMID und DRING, 1996a; SCHMID et al., 1996).

Da diese Stimulation nicht auf einer erhöhten Entnahme von  $C_i$  aus dem umgebenden Seewasser begründet sein kann, muß das  $CO_2$  aus einer internen Quelle stammen. Daraus wurde

geschlossen, dass Blaulicht die Freisetzung von  $\text{CO}_2$  aus dem internen Kohlenstoffspeicher induziert, während das Auffüllen des Speichers in Abwesenheit von BL - beispielsweise im Rotlicht - stattfindet.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass (interne und externe) Carboanhydrasen zwar eine effektive Versorgung der Photosynthese mit  $\text{CO}_2$  gewährleisten, bei *E. siliculosus* aber keine spezifisch blaulichtabhängige Funktion im  $\text{C}_i$ -Akquisitionssystem besitzen (SCHMID und DRING, 1996b).

Bezugnehmend auf diese Charakteristika erstellten SCHMID und DRING (1996a; b) ein Modell eines  $\text{C}_i$ -Akquisitionsmechanismus für *E. siliculosus*, das von der Existenz eines ähnlich der  $\text{C}_4$  / CAM-Photosynthese zugrundeliegenden Metabolismus ausging. Dabei wurde Malat als möglicher Speichermetabolit vorgeschlagen. Als Enzym der nichtphotosynthetischen Carboxylierung sollte die unter Braunalgen weit verbreitete PEPCK fungieren. Malat-Enzym bzw. ein Isoenzym der PEPCK wurden als mögliches Decarboxylierungs-Enzym diskutiert.

**Abb. 1.3:** Von SCHMID und DRING (1996a) vorgeschlagener Mechanismus zur Kohlenstoff-Akquisition in *Ectocarpus siliculosus* (dünne Pfeile stehen für Stoffwechselreaktionen, dicke für Transportmechanismen; CA = Carboanhydrase)

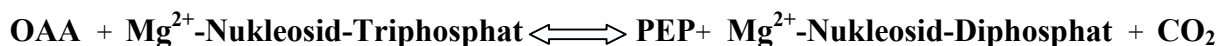
Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass neben  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NADP}^+$ -Malat-Dehydrogenasen auch PEPCK und  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzym mit hohen Aktivitäten in der Alge auftreten. Pyruvat- $\text{P}_i$ -Dikinase als vorgeschlagenes PEP-regenerierendes Enzym konnte hingegen nicht detektiert werden, wodurch die Vollständigkeit des vorgeschlagenen  $\text{C}_4$ -Zyklus fraglich wurde (BUSCH und

SCHMID, 2001). Auch die postulierte BL-Abhängigkeit des Malat-Enzyms bzw. der PEPCK zeigte sich nicht.

Erst im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass nicht ein organischer, sondern ein anorganischer Kohlenstoffspeicher die BL-Stimulation der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung ermöglicht (SCHMID und HILLRICHS, 2001; HILLRICHS und SCHMID, 2001). Damit stellte sich verstärkt die Frage nach der Funktion der beiden in solch hohen Aktivitäten in der Alge auftretenden Enzyme PEPCK und  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzym.

## 1.7 Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase katalysiert die reversible Mononukleotid-abhängige Decarboxylierung und Phosphorylierung von Oxalacetat (OAA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) und Kohlendioxid:



Die Verbreitung des Enzyms erstreckt sich von Bakterien und Protoctisten\* über Pilze bis hin zu Pflanzen und Tieren. Dabei sind zwei verschiedene Formen der PEPCK zu unterscheiden. Während die eine ausschließlich ATP nutzt, bzw. höhere Aktivitäten bei der Katalyse mit Adenin-Nukleotiden zeigt (PEPCK-ATP: EC 4.1.1.49), verwendet die zweite Form Guanin-, in einigen Fällen auch Inosin-Nukleotide (PEPCK-GTP: EC 4.1.1.32; UTTER UND KOLENBRANDER, 1972). Das ATP-abhängige Enzym wurde in Blütenpflanzen, Asco- sowie Basidiomyceten, Braun-, Rot- und Grünalgen, Diatomeen, Dinoflagellaten, Kinetoplasten von Trypanosomen und zahlreichen Bakterien nachgewiesen. Die GTP-PEPCK tritt dagegen in Säugern, Vögeln, Fischen, Insekten, Mollusken, Plattwürmern, Nematoden, Euglena-Arten sowie auch in Bakterien auf (WALKER UND CHEN, 2002).

Der dieser Verbreitung zugrundeliegende evolutionäre Ursprung ist unklar. Während für die Enzyme innerhalb ihrer jeweiligen Gruppe (ATP- oder GTP-abhängig) eine signifikante (40-80%) Aminosäuresequenz-Identität nachgewiesen wurde (LINSS et al., 1993; REYMOND et al., 1992), zeigte sich keine statistisch signifikante Gesamtsequenz-Homologie (18-20%) beim Vergleich der PEPCKs beider Klassen (TRAPANI et al., 2001; MATTE et al., 1997). Trotzdem verfügen die Enzyme beider Gruppen über konservierte Motive. Diese treten insbesondere im Bereich der Substratbindestellen (für OAA und NTP) auf, bzw. sind an der Interaktion mit

---

\* Der Terminus "Protoctista" wird hier nach der Definition von MARGULIS und SCHWARTZ (1998) verwendet

zweiwertigen Metall-Ionen beteiligt, welche bei beiden Enzymtypen unerlässlich für die katalytische Funktion sind (LINSS et al., 1993; MATTE et al., 1997; WALKER und CHEN, 2002).

Aufgrund der dargelegten Sequenzeigenschaften argumentieren WALKER und CHEN (2002), dass die rezenten PEPCK-Formen von einem gemeinsamen Enzymvorläufer ausgehend durch divergente Entwicklung entstanden sind. Dabei wird die geringe Gesamtsequenzhomologie zwischen den ATP- und GTP-abhängigen Enzymen sowie ihre Art der Verbreitung in den verschiedenen Organismen als Hinweis für eine evolutionär sehr früh erfolgte Divergenz gewertet.

Für bislang drei verschiedene Organismen konnte die Kristallstruktur der PEPCK ermittelt werden: für die ATP-PEPCK aus *Escherichia coli* (MATTE et al., 1996) und dem Protoctisten *Trypanosoma cruzi* (TRAPANI et al., 2001) sowie für die GTP-PEPCK des Menschen (DUNTEN et al., 2002). Alle drei Enzyme zeigen untereinander eine sehr große Ähnlichkeit in ihrer Tertiärstruktur. So ist die PEPCK aus je einer N- und einer C-terminalen Domäne zusammengesetzt, die gleichgroß sind und die im nativen Zustand (ohne Substrat) durch eine tiefe Spalte voneinander getrennt vorliegen, in der sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Lediglich die Bindestelle für die Nukleotid-Substrate im aktiven Zentrum des Enzyms zeigt deutliche Unterschiede zwischen den GTP- und den ATP-abhängigen PEPCKs (DUNTEN et al., 2002).

Alle bisher untersuchten GTP-PEPCKs wurden ausschließlich als Monomere identifiziert. Demgegenüber reicht die Vielfalt der ATP-abhängigen Enzyme von Monomeren in Bakterien wie beispielsweise *E. coli* (GOLDIE und SANWAL, 1980), Dimeren (z.B. *Trypanosoma brucei*; HUNT und KÖHLER, 1995), Tetrameren in *Saccharomyces cerevisiae* (TOTORA et al., 1985) oder einigen Blütenpflanzen (WALKER et al., 1995) bis hin zu einem Hexamer, welches in *Urochloa panicoides* (BURNELL, 1986) nachgewiesen wurde.

Für das dimere Enzym aus *T. cruzi* (CYMERYNG et al., 1995) wurde anhand kristallographischer Studien gezeigt, dass die Monomer-Monomer Interaktion ausschließlich auf einen kleinen Bereich der beiden N-terminalen Domänen beschränkt ist. Dies ermöglicht den freien Zugang der Substrate zu den aktiven Zentren des Enzyms sowie eine ungehinderte Konformationsänderung der Domänen jeder Untereinheit während der Substratbindung (TRAPANI et al., 2001). Im Gegensatz zu Mono- und Dimeren liegen zur räumlichen Anordnung der Untereinheiten bei Tetra- und Hexameren noch keine Daten vor.



### 1.7.1 Physiologische Rolle der PEPCK

Die zentrale Funktion der PEPCK in Bakterien, Hefe und Vertebraten besteht in der Initiation des Gluconeogenese-Stoffwechselweges (UTTER und KOHLENBRANDER, 1972). Dabei ist im Fall der Bakterien die Expression der PEPCK in der Regel von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig. Während Gluconeogenesesubstrate wie beispielsweise organische Säuren oder Aminosäuren die Bildung der PEPCK fördern, wird sie durch Glucose inhibiert. Ausnahmen wurden in *E. coli* (SAUER et al., 1999), *Bacillus subtilis* (SAUER et al., 1997) und *Corynebacterium glutamicum* (PETERSEN et al., 2001) gefunden, die PEPCK unter bestimmten Bedingungen auch dann ausbilden, wenn die Kultivierung in Anwesenheit von Glucose erfolgt.

Vergleichbar zur Situation in Bakterien tritt auch die cytosolische PEPCK in Niere und Leber (als Hauptort der Gluconeogenese) von Vertebraten nur dann auf, wenn Glucose-Mangel in den Zellen besteht. Die Gabe von Glucose führt dabei (aufgrund hormoneller Steuerung der Transkription der entsprechenden Gene) zu einem schnellen Verschwinden des Enzyms (MCGRANE et al., 1992).

Neben der cytosolischen konnte auch eine mitochondriale PEPCK in der Leber von Vertebraten lokalisiert werden. Diese ist an der Umwandlung von Lactat, welches vor allem bei Muskularbeit in großen Mengen anfällt, zu Zuckern beteiligt (HANSON und PATEL, 1994). Außer als Komponente des Gluconeogenese-Reaktionsweges kommt der PEPCK in diesem Fall gleichzeitig eine Rolle in der pH-Regulation zu, da die Umwandlung von Lactat zu Zuckern einen protonenverbrauchenden Reaktionsschritt darstellt. Die Funktion der PEPCK in zahlreichen weiteren Zelltypen von Vertebraten bleibt zu klären (HANSON und PATEL, 1994; HANSON und RESTHEF, 1997).

Auch für Blütenpflanzen wurde die Beteiligung der PEPCK an den Reaktionswegen der Gluconeogenese beschrieben. Insbesondere die Samenkeimung wurde hinsichtlich der Umwandlung von Aminosäuren und Lipiden zu Zuckern intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der PEPCK mit 3-Mercaptopikolinsäure auch die Gluconeogenese inhibiert wurde (LEEGOOD and AP REES, 1978).

Bei Tomaten und Weintrauben werden während der Fruchtreifung organische Säuren über den Weg der Gluconeogenese unter Beteiligung der PEPCK zu Zuckern umgewandelt (WALKER et al., 1999; FAMIANI et al., 2000).

Neben der Gluconeogenese stellt der photosynthetische CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus bei Blütenpflanzen einen zweiten wichtigen Reaktionsweg dar, in den die PEPCK involviert ist. In C<sub>4</sub>-Pflanzen wird Malat bzw. Aspartat in den Bündelscheiden-Zellen decarboxyliert. Dabei

freigesetztes CO<sub>2</sub> diffundiert in die Chloroplasten und wird dort durch den Calvin-Zyklus fixiert und reduziert (Übersichtsartikel: HATCH, 1987; EDWARDS et al., 2001). Bis vor wenigen Jahren wurden C<sub>4</sub>-Pflanzen aufgrund der Enzyme, welche die Decarboxylierung der C<sub>4</sub>-Säuren in den Bündelscheidenzellen katalysieren, noch in drei verschiedene Typen klassifiziert: den PEPCK-, den NAD<sup>+</sup>-Malat-Enzym- und den NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym-Typ. FURUMOTO et al., 1999 und WINGLER et al., 1999 konnten am Beispiel von Mais zeigen, dass mit dem PEPCK/NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym-Typ mindestens ein weiterer zu unterscheiden ist.

DITTRICH et al. wiesen 1973 nach, dass die PEPCK in großen Mengen in vielen CAM-Pflanzen auftritt. Sie zeigten, dass auch CAM-Pflanzen in zwei verschiedene Typen zu untergliedern sind, je nachdem, ob PEPCK oder Malat-Enzym während des Tages als Decarboxylierungsenzym der organischen Säuren dient. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten, dass die PEPCK weitverbreitet als Decarboxylase in CAM-Pflanzen eingesetzt wird (BLACK et al., 1996; CHRISTOPHER und HOLTUM, 1996). Bei einigen dieser Pflanzen sind die PEPCK und der CAM-Reaktionsweg durch besondere Bedingungen der Umgebung, beispielsweise Trockenheit, induzierbar (LÜTTGE, 1996; BORLAND et al., 1998).

Neuere immunhistochemische und *in situ*-mRNA-Hybridisierungs-Untersuchungen ergaben, dass die PEPCK außer (wie bereits bekannt) in Blättern von C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen sowie dem Speichergewebe keimender Samen und einiger Früchte in verschiedenen Geweben oder Zellen vieler Blütenpflanzen in besonders großen Mengen vorkommt. Dazu gehören beispielsweise Gewebe von Wurzeln, Blütenstielen, sich entwickelnden Samen und Blättern von C<sub>3</sub>-Pflanzen (KIM und SMITH, 1994; WALKER et al., 1999; CHEN et al., 2000; LEA et al., 2000). Im Allgemeinen handelt es sich dabei um heterotrophe Zellen, wie beispielsweise Phloem, Xylem-Parenchym, Pericykel und Trichome (WALKER et al., 1999; CHEN et al., 2000), für die hohe Stoffwechselraten anzunehmen sind. Die Funktion der PEPCK in diesen Zellen ist unklar. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass sie an der intrazellulären pH-Regulation dieser am Stickstoff-Metabolismus beteiligten Gewebe beteiligt sein könnte.

### 1.7.2 Die Rolle der PEPCK in Algen

Wie bereits erwähnt, tritt die PEPCK auch bei zahlreichen Mitgliedern der phylogenetisch uneinheitlichen Gruppe der Algen auf. Während die Funktion der PEPCK in Rotalgen zur Zeit noch unklar ist (HOLBROOK et al., 1988; ISRAEL et al., 1991), konnte für zumindest eine

Dinoflagellaten-Art die PEPCK als Enzym der CO<sub>2</sub>-Fixierung im Dunkeln identifiziert werden (DESCOLAS-GROS und ORIOL, 1992).

Wie oben dargelegt, ist die PEPCK der Grünalge *Udotea flabellum* als Komponente eines CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus zu sehen (REISKIND und BOWES, 1991; 1995), während für das Enzym der Diatomee *Thalassiosira weissflogii* eine anaplerotische\* Rolle postuliert wurde (JOHNSTON et al., 2001).

Braunalgen verfügen zum Teil über beträchtliche Mengen PEPCK. In Bezug auf den Gesamtproteingehalt entspricht der Gehalt der PEPCK mancher Braunalgen dem in Blättern von C<sub>4</sub>-Pflanzen (JOHNSTON und RAVEN, 1989; WALKER et al., 2002). Da nur geringe bzw. keine Aktivitäten weiterer potentieller Carboxylasen wie PEPC, PEP-Carboxytransphosphorylase und Pyruvat-Carboxylase in Braunalgen nachgewiesen werden konnten, wurde geschlossen, dass die PEPCK in dieser Algengruppe die lichtunabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung katalysiert (KREMER und KÜPPERS, 1977; KERBY und EVANS, 1983b; CABELLO-PASINI und ALBERTE, 2001). Darüber hinaus wurde beispielsweise für *Ascophyllum nodosum* gezeigt, dass die lichtunabhängige Fixierung von CO<sub>2</sub> im Licht wesentlich höher ist als in Dunkelheit (JOHNSTON und RAVEN, 1989). Der PEPCK in *Laminaria hyperborea* wurde eine anaplerotische Rolle von WEIDNER und KÜPPERS (1982) zugewiesen. Das Enzym wurde als Carboxylase zur Bildung von Oxalacetat (ausgehend von über die Glycolyse metabolisiertem Mannitol) vorgeschlagen, welches zur Auffüllung des Citronensäure-Zyklus dienen sollte, um so das Wachstum der Thallusspreiten dieser Algenart bei geringen Photosyntheseraten im Frühjahr zu gewährleisten.

Eine potentielle Rolle der PEPCK im photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus von Braunalgen, insbesondere in einem der C<sub>4</sub>-Photosynthese von höheren Pflanzen ähnlichen Weg, wird seit langem diskutiert (WEIDNER und KÜPPERS, 1973; JOSHI et al., 1974; SCHMID und DRING, 1996a). Viele der dahingehenden Untersuchungen sprechen jedoch gegen die Existenz eines C<sub>4</sub>-Weges in Braunalgen (siehe KREMER und KÜPPERS, 1977; JOHNSTON, 1991; HILLRICHS und SCHMID, 2001).

## 1.8 Das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym

Das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym (NADP<sup>+</sup>-abhängige decarboxylierende Malat-Dehydrogenase; NADP-ME: EC 1.1.1.40) katalysiert die reversible oxidative Decarboxylierung von L-Malat zu

---

\* anaplerotische Reaktionen dienen der Nachlieferung von Zwischenprodukten in den Citratcyclus, die diesem zuvor (z.B. durch Nitrataassimilation) entzogen wurden

Pyruvat und  $\text{CO}_2$ , verbunden mit der Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu NADPH. Als Cofaktor ist ein zweiwertiges Metall-Ion essentiell für diese Reaktion (HSU et al., 1976). NADP-ME-Aktivität wurde erstmals von OCHOA et al. (1947) aus Taubenleber isoliert. Seitdem konnte das Enzym in Bakterien, Hefe, Pilzen, Protoctisten, Pflanzen sowie Tieren, einschließlich des Menschen, nachgewiesen werden. Die Konformation des nativen  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzyms reicht vom Monomer einiger Bakterien (London et al., 1971) bis hin zum Oktamer bei *Escherichia coli* (SPINA et al., 1970). So liegt das NADP-ME II aus *Trypanosoma cruzi* als Dimer (AVILAN und GARCIA, 1994), die cytosolischen und mitochondrialen Isoformen aus Säugetieren hingegen als Tetramere vor (LOEBER et al., 1994a). Für höhere Pflanzen wurde eine Quartärstruktur sowohl aus vier als auch aus sechs identischen Untereinheiten für das native Enzym nachgewiesen (EDWARDS und ANDREO, 1992; SAITOU et al., 1992; COLOMBO et al., 1997; FERREYRA et al., 2003).

Aminosäuresequenzvergleiche zeigten, dass signifikante Sequenzidentitäten der  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzyme zwischen verschiedenen Organismen bestehen. Beispielsweise teilen die Enzyme des Menschen, der Ratte und der Maus 90% Sequenz-Identität (LOEBER et al., 1994a). Selbst zwischen dem chloroplastidären  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzym aus *Zea mays* und dem mitochondrialen Enzym des Menschen besteht eine Sequenzidentität von 47% (LOEBER, 1994b). Beim Vergleich des Enzyms aus Mais mit dem aus Ratte und Maus ergibt sich sogar eine 49%ige Sequenz-Identität (ROTHERMEL und NELSON, 1989). Demgegenüber zeigt das Malat-Enzym keine erkennbare Sequenz-Homologie zu anderen Dehydrogenasen (einschließlich Malat-Dehydrogenase) oder Decarboxylasen (XU et al., 1999; YANG et al., 2000). Wie bereits aufgrund der weiten Verbreitung und der hohen Aminosäuresequenz-Homologie zu vermuten ist, erfüllt das NADP-ME wichtige biologische Funktionen. Die wichtigste physiologische Funktion in Tieren besteht in der Bereitstellung von NADPH für die Fettsäurebiosynthese (FRENKEL, 1975; GOODRIDGE et al., 1996). In Pilzen konnte eine Beteiligung an der Regulation der Lipid-Akkumulation nachgewiesen werden (WYNN et al., 1997; WYNN et al., 1999).

In Pflanzen existieren diverse  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzym-Isoformen. Grundsätzlich ist dabei zwischen plastidären und cytoplasmatischen Enzymen zu unterscheiden. Das in den Bündelscheidenzellen von  $\text{C}_4$ -Pflanzen lokalisierte Enzym (MAURINO et al., 1997), dessen Expression lichtreguliert erfolgt (MAURINO et al., 1996), katalysiert die Decarboxylierung von Malat. Dabei freigesetztes  $\text{CO}_2$  dient der Rubisco als Substrat photosynthetischer Kohlenstoff-Fixierung. Neuere Untersuchungen ergaben, dass dieses Isoenzym auch eine Rolle bei der Reparatur von UV-Schäden spielt (DRINCOVICH et al., 1998; CASATI, et al., 1998). Analog zur Funktion des photosynthetischen  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzyms in Chloroplasten von  $\text{C}_4$ -Pflanzen ist

die Rolle von zumindest einigen im Cytoplasma von CAM-Pflanzen lokalisierten Isoenzymen zu sehen (CUSHMAN und BOHNERT, 1997; HONDA et al., 2000). Wie für die plastidäre Isoform aus Wurzeln von Mais (MAURINO et al., 2001) wurde für ein cytosolisches Enzym aus Bohnen ( $C_3$ -Pflanze) sowie ein chloroplastidäres Enzym in Weizenhalmen eine Korrelation mit der Lignin-Biosynthese zur zellulären Abwehr beobachtet (SCHAAF et al., 1995). Auch bei der Fettsäuresynthese sich entwickelnder Ölsamen spielt das Enzym durch die Lieferung von Pyruvat und NADPH eine entscheidende Rolle (SMITH et al., 1992). Desweiteren dient es im Cytosol von  $C_3$ -Pflanzen während der Fruchtreifung zur Bereitstellung der Substrate Pyruvat und NADPH (FAMIANI et al., 2000). Aufgrund der weiten Verbreitung in pflanzlichen Geweben werden für das  $NADP^+$ -Malat-Enzym weitere *housekeeping*-Funktionen, unter anderem auch die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH, diskutiert (DAVIES, 1986; SAKANO, 1998; SAKANO, 2001).

Im Gegensatz zu den zum Teil sehr detailliert dargelegten Funktionsbeschreibungen des  $NADP^+$ -Malat-Enzyms in Pflanzen liegen keine vergleichbaren Daten für das Enzym in Braunalgen vor. Lediglich für das  $NADP$ -ME aus *Spatoglossum pacificum* wurden einfache Rohextrakt-Enzymaktivitätsbestimmungen durchgeführt (AKAGAWA et al., 1972).

## 1.9 Zielsetzung

Die filamentöse Braunalge *E. siliculosus* zeigt hohe Aktivitäten der Enzyme PEPCK und  $NADP^+$ -Malat-Enzym. Die zunächst vermutete Rolle beider Enzyme in einem für diese Alge postulierten  $C_4$ /CAM-Metabolismus (SCHMID und DRING, 1996a; b) wurde fraglich, nachdem zum einen nicht alle für einen solchen Stoffwechselweg benötigten Enzyme detektiert werden konnten (BUSCH und SCHMID, 2001) und zum anderen nachgewiesen wurde, dass die dafür zu erwartenden Intermediate in zu geringen Konzentrationen in der Alge auftreten, um die in diesem Zusammenhang beobachtete Speicherfunktion für  $CO_2$  zu ermöglichen (HILLRICHS und SCHMID, 2001).

Zur Klärung einer möglichen Funktion der beiden Enzyme in der Alge sollten diese im Rahmen dieser Arbeit gereinigt und anschließend kinetisch charakterisiert werden. Anhand der daraus gewonnenen Daten waren Vergleiche mit bereits charakterisierten PEPCKs und Malat-Enzymen anderer Organismen geplant. Ferner sollten beide Enzyme mit Hilfe spezifischer Antikörper intrazellulär lokalisiert werden.

Um Informationen über die Primärstruktur der Proteine zu erhalten, sollten die gereinigten Enzyme ansequenziert werden. Diese Sequenzdaten sollten für die anschließende Suche nach der codierenden DNA verwendet werden. Ausgehend von isolierter RNA sollte dabei die Suche nach der entsprechenden cDNA über 3'-RACE und Nukleinsäuresequenzierung erfolgen. Mit genaueren Kenntnissen der Aminosäuresequenz der beiden Enzyme aus *E. siliculosus* sollten Vergleiche mit bekannten pro- und eukaryotischen PEPCKs bzw. Malat-Enzymen erfolgen und Aussagen über Verwandtschaft und Ähnlichkeiten im molekularen Mechanismus der Katalyse ermöglicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsmaterialien

Sämtliche, für molekularbiologische Arbeiten, eingesetzten Pufferlösungen und Medien sowie Glas und Kunststoffgefäße wurden durch Dampfsterilisation für 20 min (für Arbeiten mit DNA) bzw. 60 min (für Arbeiten mit RNA) von Nukleaseaktivitäten befreit.

#### 2.1.1 Organismen

<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Linie <i>Es</i> BHI 293
	Linie <i>Es</i> Par 1027 Sp.
<i>Pylaiella littoralis</i>	Linie PI BHI 393
<i>Kalanchoë daigremontiana</i>	
<i>Spinacia oleracea</i>	
<i>Zea mays</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>DH5<math>\alpha</math></i> [F- <i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ) <i>hsdR7</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> ] (freundlicherw. z. Verfügung gestellt von M. Ruiz-Hidalgo, Salamanca, Spanien; vgl. RUIZ-HIDALGO et al., 1997)

#### 2.1.2 Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete, nachfolgend aber nicht aufgeführte, Standard-Labor-Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

Acrylamid (2 x krist.)	Serva, Heidelberg
ADP	Sigma, München
Agarose (DNA)	Biozym, Hameln
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg

Bacto™-Agar	Difco, USA
Betain	Sigma, München
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat)	Sigma, München
D(+)-Biotin (Vit. H)	Sigma, München
Bromphenol-Blau	Fluka, Neu-Ulm
CDFFDA (Carboxy-Difluorofluorescein-Diacetat)	Molecular Probes, USA
Coomassie Blue R-250	Serva, Heidelberg
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Roth, Karlsruhe
Cyanocobalamin (Vit. B <sub>12</sub> )	Merck, Darmstadt
Deoxycholat, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Dodecylsulfat, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Ethanolamin	Sigma, München
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
L-Malat, (Na <sub>2</sub> -Salz)	Sigma, München
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell
Methylenbisacrylamid (2 x krist.)	Serva, Heidelberg
Mowiol® 4-88	Fluka, Neu-Ulm
NADH (Na-Salz)	Sigma, München
NADP (Na-Salz)	Sigma, München
NBT (Nitroblau-Tetrazolium)	Sigma, München
Paraformaldehyd	Sigma, München
Phosphoenolpyruvat, Tri(cyclohexylammonium)Salz	Sigma, München
Polypuffer™ 96	Pharmacia, Uppsala
Ponceau S, (Na-Salz)	Sigma, München
p-Phenylendiamin	Fluka, Neu-Ulm
Rinderserum-Albumin (Fraktion V)	Sigma, München
Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Thiamin (Vit. B <sub>1</sub> )	Sigma, München
Thioglycolat (Na-Salz)	Merck, Darmstadt
Thiosulfat, (Na-Salz)	Merck, Darmstadt



TRIZOL <sup>®</sup> Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein
Trypton Pepton	Difco, USA
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, München
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Roth, Karlsruhe

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Prozentangaben in den Rezepten bezeichnen bei Feststoffen Gewicht pro Volumen (w/v) und bei Flüssigkeiten Volumen pro Volumen (v/v).

Alle nicht aufgeführten Puffer wurden vom Hersteller in den entsprechenden Kits mitgeliefert.

Acrylamid-Lösung	24% Acrylamid, 0,75% Methylenbisacrylamid in aqua dest., Lösung filtriert
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
AP-Substratlösung	1 ml AP-Puffer, 4,5 $\mu$ l NBT-Lösung, 3 $\mu$ l BCIP-Lösung (unmittelbar vor Gebrauch frisch anzusetzen)
BCIP-Lösung	100 mg BCIP in 2 ml 100% Dimethylformamid
Block-Lösung	5% Magermilchpulver in TBS-Tween
10x DNA-Probenpuffer	30% Glycerin, 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA, 1% SDS, 0,025% Bromphenolblau, (pH 8.0)
EB	10 mM Tris-HCl (pH 8.5)
Ethanolamin-Puffer	25 mM Ethanolamin-Essigsäure (pH 9.4), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT
GTE	25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA

Homogenisationspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Na-Ascorbat, 500 mM Sorbit, 5 mM DTT
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl (mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt)
Mais-Extraktionspuffer	0,1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM DTT, 2,5% Polyvinylpyrrolidon (PVPP) (vorgequollen), 25 mM Na-Ascorbat
20x MOPS	0,4 M MOPS, 0,1 M Na-Acetat, 0,02 M Na <sub>2</sub> -EDTA, (mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt)
NBT-Lösung	100 mg NBT in 1,3 ml 70% Dimethylformamid
PBS	0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,01 M Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.2)
Polypuffer 96	Polypuffer 96 (Pharmacia; 1:5 verdünnt mit aqua dest.)- Essigsäure (pH 6.0), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT
Ponceau-Lösung	0,4% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure
Protein-Assay-Reagenz I	4 mM CuSO <sub>4</sub> , 8,5 mM KNaTartrat
Protein-Assay Reagenz II	0,8 mM NaOH, 10% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Protein-Assay-Reagenz III	5% Natriumdodecylsulfat (SDS)
Protein-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% Glycerin, 4% SDS
Puffer A	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT
Puffer B	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT

RNA-Denaturierungspuffer	6,6% Formaldehyd, 50 %Formamid, 5% 20x MOPS
RNA-Extraktions-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1,5 M NaCl, 2% CTAB, 50 mM EDTA, 50 mM DTT
5x RT-Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 30 mM MgCl <sub>2</sub>
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose (pH 7.0)
Sammelgel-Puffer	0,125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0,125% SDS
Spinat-Extraktionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM Na-EDTA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 40 mM Na-Ascorbat, 5 mM DTT, 2,5% PVPP (vorgequollen)
10x TBE	0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA
TBS	10 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 150 mM NaCl
TBS-Tween	0,05% Tween <sup>®</sup> 20 in TBS
T-Puffer	10 mM PIPES-KOH (pH 6.7), 55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 10% Methanol
Trenngel-Puffer	0,75 M Tris-HCl (pH 8.8), 0,2% SDS
Tricine-EDTA-Puffer	10 mM Tricine-KOH (pH 8.5), 1 mM EDTA
X-Gal-Lösung	2% X-Gal in 100% Dimethylformamid

### 2.1.4 Enzyme und Inhibitoren

Advantage™ 2 Polymerase Mix (50 x)	BD Clontech, Heidelberg
Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (MDH, aus Rinderherz, 2500 Units/mg Protein)	Sigma, München
3-Mercaptopikolin-Säure	synthetisiert im Labor von Prof. Sandro Ghisla, Fak. Biologie, Universität Konstanz, nach einer von BERKOFF et al. entwickelten und als US Patent #3860716 registrierten Vorschrift
PowerScript™ Reverse Transkriptase	BD Clontech, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen (je 10 U/μl):	Fermentas, St.Leon-Rot
- <i>Eco</i> R I	
- <i>Eco</i> 32 I ( <i>Eco</i> R V)	
- <i>Bcu</i> I ( <i>Spe</i> I)	
Ribonuklease A	Roth, Karlsruhe

### 2.1.5 Molekularbiologische Kits

NucleoTrap® Nucleic Acid Purification Kit	BC Clontech, Heidelberg
Oligotex™ mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD Clontech, Heidelberg
TOPO™ TA Cloning® Kit	Invitrogen, USA

### 2.1.6 DNA-/RNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtstandards

Lambda DNA/ <i>Eco</i> R I + <i>Hind</i> III Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Ladder (High Range)	Fermentas, St. Leon-Rot
MW-SDS-70 L (MG-Marker Kit)	Sigma, München
Gel-Filtrations-Standard	Bio-Rad, München

### 2.1.7 Antikörper

#### Primärantikörper (monoklonal)

- Maus Anti-Tyrosin-Tubulin

Sigma, München

#### Primärantikörper (polyklonal)

- Kaninchen Anti-NADP:Malat-Enzym  
(aus Maisblättern); IgG

freundlicherw. zur Verfügung gestellt von  
Prof. C. Schnarrenberger (Berlin),  
(FATHI und SCHNARRENBGER, 1990)

- Kaninchen Anti-PEPCK  
(aus *Urochloa panicoides*); Serum

freundlicherw. zur Verfügung gestellt von  
Prof. J. Burnell (Brisbane),  
(FINNEGAN und BURNELL, 1995)

- Kaninchen Anti-RUBISCO  
(aus Spinat), Serum

freundlicherw. zur Verfügung gestellt von  
Dr. U. Groß (Gießen), (GROß et al., 1993)

- Kaninchen Anti-PEPCK  
(aus *E. siliculosus*); IgG

im Rahmen dieser Arbeit hergestellt,  
(siehe 2.13)

#### Sekundärantikörper

-Ziege Anti-Kaninchen IgG (Fc),  
an alkalische Phosphatase konjugiert

Promega, Mannheim

-Ziege Anti-Maus IgG (H+L),  
an Cy<sup>TM</sup>2-konjugiert

Dianova, Hamburg

-Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L),  
an FITC-konjugiert

Dianova, Hamburg

### 2.1.8 Chromatographie-Matrizes und -Säulen

HiTrap<sup>TM</sup> Protein G (1 ml-Säule)

Amersham Pharmacia, Freiburg

Sephadex<sup>®</sup> G-25

Pharmacia, Uppsala

Sephadex<sup>®</sup> G-100

Pharmacia, Uppsala

PBM<sup>TM</sup> 94 (Polypuffer-Austauscher)

Pharmacia, Uppsala

Protein A (*Acrylic beads*)

Sigma, München

Bio-Sil<sup>®</sup> SEC 250-5 Säule

Bio-Rad, München

Red Sepharose<sup>®</sup> CL-6B

Pharmacia, Uppsala

Resource<sup>TM</sup> Q (1 ml-Säule)

Pharmacia, Uppsala

### 2.1.9 Membranen, Filter, Konzentratoren

Centriprep <sup>®</sup> 10 Konzentrator	Amicon, Beverly, USA
Culture Capsule (0,2 µm)	GelmanSciences, Michigan, USA
Dialysemembran Typ 8	Biomol, Hamburg
Gel-Blotting-Papier GB002 (Whatman <sup>®</sup> 3MM)	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon <sup>™</sup> -P (PVDF-Membran; 0,45 µm)	Millipore, Bedford, USA
Immobilon <sup>™</sup> -P <sup>SQ</sup> (PVDF-Membran; 0,1 µm)	Millipore, Bedford, USA
Microcon <sup>®</sup> Konzentrator	Amicon/Millipore, USA
Miracloth	Calbiochem, La Jolla, Kanada

### 2.1.10 Geräte

#### Photometer

UV-Vis- Spektrophotometer UV-1202 mit Programmkarte Kinetics-2	Shimadzu, Duisburg
Spektralphotometer UV-3000 mit Datenverarbeitungsprogramm Spectrafile	Shimadzu, Duisburg Labcontrol, Köln

#### Zentrifugen

Mikrozentrifuge Mikro 12-24 Rotor: Winkelrotor 12-fach	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Biofuge 22 R Rotoren: # 3740, # 3748	Heraeus, Sepatech, Osterode
Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge RC 5B Plus Rotor: SS-34	Du Pont/ Sorvall Bad Homburg
Laborfuge 400 R Rotor: # 8179	Heraeus, Sepatech, Hanau

**HPLC**

HPLC Pumpe: 422 Master	komplett bezogen von
Gradientenformer: M88	Kontron Instruments,
Entgaser: Degasys DG-1210	Neufahrn
Diode Array Detektor 440	
Steuerungs- und Auswertungssoftware:	
KromaSystem 2000	

**Elektrophorese- und Western-Blotting-Zubehör**

Biometra Minigel G 41	Biometra, Göttingen
Blottingkammer (mit L=13 cm, B=13 cm, H=17 cm)	Nachbau
Consort E 321	Consort nv, Turnhout, Belgien
Microcomputer Elektrophoresis	Uni Equip, Martinsried
Power Supply E 424	
Mini-SUB <sup>®</sup> Cell GT	Bio-Rad, München
Power Pac 300	Bio-Rad, München
WIDE Mini-SUB <sup>®</sup> Cell GT	Bio-Rad, München

**Konfokales Laser Scanning Mikroskop**

TCS SP2	komplett bezogen von
Mikroskop: Upright: Leica DM RE	Leica, Weinheim
Laser: Ar 65 mW	
Objektiv: HCX PL APO 40x/1.25-0,75 Öl CS	
Epifluoreszenz-Lampe: HB 50 W	
Inverses Mikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen

**Sonstige Geräte**

MiniCycler <sup>TM</sup>	Biozym, Hess. Oldendorf
Optisches Leistungsmeßgerät:	Gigahertz-Optik GmbH,
Optometer P-9201-2-TF	Puchheim
Meßkopf: Siliciumdiode	
Fraktionensammler: Redi Frac	Pharmacia, Uppsala
Schlauchpumpe: Pump 1	Pharmacia, Uppsala

## 2.2 Organismen und Kultivierung

### 2.2.1 Algenkultur

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden zwei Linien von *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kultur der sporophytischen Phase der Algen (Es PAr 1027 Sp.), die von Prof. D.G. Müller (Konstanz) 1978 an der Küste von Port Aransas (Texas, USA) gesammelt wurde (MÜLLER, 1979).

Die zweite, gametophytische (parthenosporophytische) *Ectocarpus*-Kultur mit dem Kürzel Es BHI 293 stammt aus Nordirland (Ballyhenry Island, Portaferry, Co. Down) und wurde 1993 von Dr. Rainer Schmid isoliert.

Die Braunalge *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellman wurde ebenfalls 1993 in Ballyhenry Island von Dr. Rainer Schmid gesammelt und in Kultur genommen (SCHMID und DRING, 1993).

Alle diese Kulturen waren monoalgal, jedoch nicht axenisch.

#### 2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Algen erfolgte in hitzesterilisierten Glasschalen mit Deckel in - nach einer Vorschrift von L. Provasoli (PROVASOLI, 1968) - angereichertem Seewasser, welches der Nordsee in der Nähe von Helgoland entnommen wurde.

Die Kulturen wurden in einem 14-tägigen Rhythmus in frisches Medium übertragen. Dabei wurde das Algenmaterial geteilt, um dessen Vermehrung zu gewährleisten. Während der Kultivierung waren die Algen einem 12 h Licht- / 12 h Dunkel-Wechsel ausgesetzt, mit dem Beginn der Lichtphase um sechs Uhr morgens (MEZ). Warm- und Kalttonfluoreszenzlampen (je 50%) dienten dabei als Lichtquellen, die eine Lichtintensität von  $1,5 \text{ Wm}^{-2}$  lieferten. Aufgrund des Licht-Dunkel-Wechsels schwankte die Temperatur zwischen ca.  $13^\circ\text{C}$  in der Nacht und  $16^\circ\text{C}$  während der Lichtphase.

#### Herstellung von PES (*Provasolis' enriched seawater medium*):

##### I P<sub>II</sub> metals

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	114,00 mg
FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	4,00 mg
MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	16,40 mg



ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	2,20 mg
CoSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,48 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	100,00 mg
pro 100 ml aqua dest.	

## II

NaNO <sub>3</sub>	350,00 mg
Na <sub>2</sub> -Phosphoglycerat	50,00 mg
Fe-EDTA (1:1 molar FeCl <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> EDTA)	2,50 mg

## III

Vitamin B <sub>12</sub>	0,010 mg
Thiamin	0,500 mg
Biotin	0,005 mg
TRIS	100,000 mg

25 ml von Lösung I sowie die Komponenten II und III wurden mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und auf pH 7.8 eingestellt.

Zu je 100 ml Seewasser wurden 2 ml dieses Ansatzes zugesetzt.

Das angereicherte Seewasser wurde anschließend sterilfiltriert und bis zum Verbrauch bei ca. 10°C dunkel aufbewahrt.

### 2.2.1.2 Sonstiges Pflanzenmaterial

#### ***Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier und Mais (*Zea mays* L.)**

*Kalanchoë* sowie acht Wochen alte Maispflanzen wurden im Gewächshaus herangezogen und vom Botanischen Garten der Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

#### **Spinat (*Spinacia oleracea* L. cv Tiradea)**

Spinatblätter (deutscher Freilandspinat) wurden von der Firma Stark, Gisselberg bezogen.

## 2.3. Enzymextraktionen

### 2.3.1 Extraktion von PEPCK und Malat-Enzym aus *E. siliculosus*

Da sowohl für die PEPCK als auch für das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus *E. siliculosus* ein Maximum der enzymatischen Aktivität um die Tagesmitte nachgewiesen worden war (BUSCH, 1998), wurden, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, die Extraktionen zur Mittagszeit durchgeführt. Dazu wurden die Algen drei Tage nach der Übertragung in frisches PES-Medium direkt aus der Kultur entnommen und in einem Sieb mit kaltem Leitungswasser kräftig abgespült, um sie weitestgehend von Salzlückständen zu befreien, die störend auf die anschließenden Extraktionsschritte hätten wirken können. Zur Bestimmung des Frischgewichtes wurden die Algen kurz zwischen Zellstofftüchern mit der Hand trockengepreßt und dann gewogen. Anschließend wurden sie in einer Porzellan-Reibschale in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu einem feinen Pulver zerrieben. Anhand mikroskopischer Kontrollen wurde überprüft, ob die Zellen vollständig aufgebrochen waren. Im nächsten Schritt erfolgte das langsame Einrühren des Algenpulvers in 10°C kalten Homogenisationspuffer (1 g Algen zu 10 ml Puffer) unter Bildung einer homogenen Suspension.

Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 50000×g und 4°C in einer Kühlzentrifuge wurde der Rohextrakt dekantiert und das Pellet verworfen. In allen folgenden Arbeitsschritten wurde der Extrakt stets kühl gehalten ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ), um einen Aktivitätsverlust der Enzyme weitgehend zu vermeiden.

### 2.3.2 Enzymextraktion aus Maisblättern

Die nachfolgend beschriebene Rohextraktgewinnung aus Maisblättern erfolgte in Anlehnung an ASAMI et al. (1979) sowie FATHI und SCHNARRENBURGER (1990).

Frisch geerntete, noch junge Maisblätter wurden mit Leitungswasser vorsichtig abgespült, zwischen Zellstofftüchern kurz getrocknet und umgehend in flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zu feinem Pulver zerstoßen. Das Pulver von je 1 g Maisblättern wurde in 2 ml auf 10°C temperierten Mais-Extraktionspuffer eingerührt. Nach dem Pressen des Extraktes durch zwei Lagen Miracloth wurde das erhaltene Filtrat in einer Kühlzentrifuge bei 50000×g und 4°C 20 min zentrifugiert. Der so gewonnene klare Rohextrakt konnte in anschließenden (Western-Blot) Analysen eingesetzt werden (siehe 3.3.1).

### 2.3.3 Herstellung eines Rohextraktes aus Spinatblättern

Die Gewinnung des Rohextraktes aus Spinatblättern erfolgte in Anlehnung an MAKINO et al. (1983). Dazu wurden bei den mit Leitungswasser abgespülten und mit Papiertüchern trockengetupften Blättern die Mittelrippe entfernt, bevor sie in flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben wurden. Das Pulver wurde anschließend in ca. 10°C kalten Spinat-Extraktionspuffer eingerührt (1 g Blattmaterial pro 4 ml Puffer). Das Homogenat wurde schließlich 20 min bei 50000×g und 4°C zentrifugiert und so die im Pellet vereinigten ungelösten Bestandteile vom klaren, stark gelb gefärbten Rohextrakt getrennt.

### 2.3.4 Enzymextraktion aus *Kalanchoë*-Blättern

Die Gewinnung eines Rohextraktes aus *Kalanchoë*-Blättern erfolgte nach dem unter 2.3.3 angegebenen Verfahren.

## 2.4 Ammoniumsulfatpräzipitation

Zur Konzentrierung der Enzyme in Rohextrakten wurden diese durch Zugabe von Ammoniumsulfat ausgefällt. Dabei wurde dem im Eisbad gekühlten Extrakt unter ständigem Rühren langsam soviel Ammoniumsulfat zugegeben, bis die Lösung den gewünschten Sättigungsgrad erreicht hatte. Durch anschließende Zentrifugation wurden die gefällten Proteine zu einem Pellet vereinigt, welches dann vom Überstand isoliert und in dem jeweils gewünschten Puffer aufgenommen werden konnte.

Rohextrakt aus *E. siliculosus* wurde, je nach Verwendungszweck, entweder auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 80% gebracht, oder einer fraktionierten Fällung mit einer ersten Sättigungsstufe bei 55% und einer zweiten bei 80% unterzogen.

Nach Zentrifugation (50000×g, 20 min, 4°C) wurde sowohl das Pellet des 55% ammoniumsulfatgesättigten Extraktes, als auch das des 80% gesättigten Extraktes in Puffer A gelöst und erneut auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 80% gebracht.

In diesem Zustand konnten die Extrakte über mindestens zwei Monate ohne nennenswerten Aktivitätsverlust (der PEPCK und des Malat-Enzyms) aufbewahrt werden.

## 2.5 Enzymreinigung

### 2.5.1 Reinigung von PEPCK aus *Ectocarpus siliculosus*

Die die gesamte PEPCK-Aktivität enthaltende Rohextrakt-Fraktion zwischen 55% und 80% Ammoniumsulfatsättigung wurde zunächst 20 min bei 50000×g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend in dem geringst möglichen Volumen in Ethanolamin-Puffer gelöst.

Zur Entsalzung und Entfernung kleinerer und größerer Proteine wurde der Extrakt auf eine zuvor mit Ethanolamin-Puffer äquilibrierte Sephadex® G-100-Säule (V = 15 ml) aufgetragen und anschließend mit dem gleichen Puffer eluiert. Das in Fraktionen aufgefangene Eluat wurde im Anschluß auf enzymatische Aktivität der PEPCK überprüft.

Die aus der Größenausschlusschromatographie resultierenden aktiven Fraktionen wurden vereinigt und unverzüglich auf eine mit Ethanolamin-Puffer äquilibrierte PBE 94 Chromatofokussierungssäule (V = 2 ml) aufgetragen. An die Säule adsorbierte Proteine wurden mit Polypuffer 96 eluiert und fraktioniert aufgefangen. Nach erneuter PEPCK-Aktivitätsbestimmung wurden die aktiven Fraktionen in einem Dialyseschlauch vereinigt und für 1,5 h gegen Puffer A dialysiert. Der so umgepufferte, teilgereinigte Extrakt wurde anschließend auf eine mit Puffer A equilibrierte, an ein HPLC-System angeschlossene, Resource™ Q Ionenaustauscher-Säule (V = 1 ml) aufgetragen.

Die Trennung der an die Säule adsorbierten Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,4 M KCl in Puffer A. Fraktionen mit PEPCK-Aktivität wurden vereinigt und mit Centriprep®10- und Microcon®-Konzentratoren konzentriert. Die konzentrierte Probe (100 µl) wurde im letzten Schritt des Reinigungsprozesses auf eine, ebenfalls an das HPLC-System angeschlossene und mit Puffer A äquilibrierte Bio-Sil®Sec-250-5 Größenausschlusschromatographie-Säule (300 mm × 7,8 mm) aufgetragen. Die Trennung, die auf der unterschiedlichen Größe der aufgetragenen Protein-Moleküle basiert, erfolgte ebenfalls mit Puffer A und ergab eine reine PEPCK-Präparation.

### 2.5.2 Reinigung von NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus *Ectocarpus siliculosus*

Rohextrakt von *Ectocarpus siliculosus*, der mit 55% Ammoniumsulfat gesättigt war, wurde 20 min bei 50000×g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in einem möglichst geringen Volumen Puffer B aufgenommen und zur Entsalzung auf eine Sephadex G-100-Säule (V = 15

ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer B äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Puffer, während das Eluat fraktioniert wurde. Die Fraktionen wurden auf Malat-Enzym-Aktivität untersucht; aktive Fraktionen wurden vereinigt und auf eine mit Puffer B äquilibrierte Red Sepharose<sup>®</sup> Cl-6B-Säule (3 ml Volumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer B gewaschen, dem 40 mM KCl zugesetzt war. Die darauffolgende Elution erfolgte mit einem Gradienten von 40 bis 350 mM KCl in Puffer B. Malat-Enzym-Aktivität aufweisende Fraktionen wurden vereinigt, in einen Dialyseschlauch gegeben und gegen Puffer B dialysiert. Das so von KCl befreite Dialysat wurde dann auf eine an das HPLC-System angeschlossene, mit Puffer A äquilibrierte Resource<sup>™</sup> Q Ionenaustauscher-Säule (Volumen 1 ml) aufgetragen. An die Säule gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten aus 0 bis 0,4 M KCl in Puffer B eluiert. Aktive Fraktionen wurden erneut vereinigt und mit den bereits unter 2.5.1 genannten Konzentratoren ankonzentriert. Wie im Falle von PEPCK endete auch die Reinigung von Malat-Enzym mit der Größenausschlusschromatographie, indem 100 µl des Konzentrates auf eine mit Puffer B equilibrierte HPLC-Säule (siehe 2.5.1) aufgetragen wurden. Auch diese Elution erfolgte mit Puffer B und ergab eine reine Malat-Enzym-Präparation.

## 2.6 Molekulargewichtsbestimmung nativer Proteine

Mit dem letzten Reinigungsschritt wurde sowohl bei PEPCK (2.5.1) als auch bei Malat-Enzym (2.5.2) gleichzeitig die Bestimmung des Molekulargewichtes beider nativer Enzyme durchgeführt. Dabei diente eine Standard-Protein-Mischung aus Rinder-Thyro- und Gamma-Globulin (670 und 158 kDa), Hühner-Ovalbumin (44 kDa), Pferde-Myoglobin (17 kDa) sowie Vitamin B<sub>12</sub> (1,35 kDa) als Referenz.

## 2.7 Protein-Bestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde in Anlehnung an PETERSON (1977) mit einem nach LOWRY et al. (1951) modifizierten Test bestimmt.

Um eventuell störende Pufferkomponenten zu entfernen, wurden die Proteine zunächst mit Trichloressigsäure (TCA) in Gegenwart von Na-Desoxycholat (DOC) gefällt. Dazu wurde die Proteinprobe mit aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt und gemischt. Nach Zugabe von je 100 µl einer

0,15%igen DOC- sowie einer 72%igen TCA-Lösung wurde erneut gut durchmischt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min in einer Mikrozentrifuge bei  $15000\times g$  zentrifugiert.

Das resultierende Sediment (nicht mehr als 40  $\mu g$  Protein) wurde anschließend in 400  $\mu l$  aqua dest. aufgenommen, mit weiteren 400  $\mu l$  einer aus den Protein-Assay-Reagenzien I, II und III im Verhältnis 1:1:2 angesetzten Lösung versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 200  $\mu l$  einer aus einem Teil Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz und fünf Teilen Wasser bestehenden Lösung beigemischt, erneut für genau 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend die Absorption bei 750 nm gegen einen Standard bestimmt.

Die unbekannten Proteinkonzentrationen wurden anhand einer zuvor mit Rinderserumalbumin erstellten Eichgerade ermittelt.

## 2.8 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen zum Zwecke der Größenbestimmung, Kontrolle der Reinheit und Konzentration von Protein-Proben sowie für Western Blot-Analysen erfolgte durch eindimensionale Elektrophorese in Polyacrylamidgelen in Anlehnung an LAEMMLI (1970).

Die  $0,1 \times 8,5 \times 7,5$  cm großen Gele setzten sich aus einem unteren ca. 6 cm langen 10- bzw. 12%igen Trenngel und dem darüber gegossenen 1,5 cm langen 4,8%igen Sammelgel zusammen. Für das 12%ige Trenngel wurden Acrylamidlösung und Trenngelpuffer zu gleichen Teilen gemischt und mit TEMED (0,5  $\mu l/ml$  Gemisch) versetzt. Das Mischungsverhältnis für ein 10%iges Trenngel betrug 5 Teile Acrylamidlösung zu 7 Teilen Trenngelpuffer. Nach dem Start der Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 3  $\mu l/ml$  einer 28,5%igen, frisch angesetzten Ammoniumpersulfatlösung wurde die Trenngellösung sofort zwischen die mit Silikonabstandhaltern abgedichteten Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach ca. 20 min war das Trenngel soweit auspolymerisiert, dass das Butanol von der Gel-Oberfläche abgenommen werden und die Sammelgel-Lösung aufgebracht werden konnte. Diese setzte sich aus einem Teil Acrylamid-Lösung und vier Teilen Sammelgelpuffer zusammen. Zusätzlich wurden TEMED in einem Volumen von 1  $\mu l$  pro Milliliter Gemisch sowie Ammoniumpersulfat (6  $\mu l/1ml$ ) von der oben genannten Stammlösung als Radikalstarter zugegeben.

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Elektrophorese wurden diese mit aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt und mit 100  $\mu l$  72%iger TCA-Lösung eine Stunde lang im Kühlschrank (4°C)

ausgefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei  $15000\times g$  (Raumtemperatur) in einer Mikrozentrifuge wurde der Überstand vollständig entfernt. Ca. 50  $\mu g$  des gefällten Proteins wurden in 20  $\mu l$  Protein-Probenpuffer aufgenommen, mit 10  $\mu l$  einer 10%igen DTT-Lösung sowie 4  $\mu l$  einer 0,01%igen Bromphenolblau-Lösung versetzt. Zur Neutralisation (Farbumschlag) wurden wenige  $\mu l$  einer 1 M Tris-Lösung zugegeben. Danach wurde die Probe für 2 min bei  $70^{\circ}C$  im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort in der Gelelektrophorese eingesetzt oder bis zu ihrem Einsatz bei  $-20^{\circ}C$  aufbewahrt.

Als Elektrophoresepuffer diente ein 25 mM Tris-Glycerin-Puffer (pH 8.6), versetzt mit 0,1% SDS. Das Einlaufen der Proteinproben in das Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 70 V (13 mA), während die Trennung bei 90 V (13 mA) vorgenommen wurde.

## **2.8.1 Anfärben von SDS-Polyacrylamidgelen**

### **2.8.1.1 Färbung mit Coomassie Blue R-250**

Nach vollendeter elektrophoretischer Trennung der Proteine wurde das Gel aus den Glasplatten herausgelöst und für zwei Stunden in einem Färbegrad aus 0,5% Coomassie Blue R-250, 30% Isopropanol und 10% Essigsäure (frisch filtrierte Lösung) fixiert und gefärbt.

Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgte mit einer Lösung aus 30% Ethanol und 7% Essigsäure in aqua dest..

Die entfärbten Gele konnten über längere Zeit in Wasser aufbewahrt werden.

### **2.8.1.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung der Polyacrylamidgele erfolgte mit geringfügigen Modifikationen nach der Methode von BLUM et al. (1987).

Dazu wurden die im Gel getrennten Proteine zunächst mit 50% Ethanol, 12% Essigsäure und 0,0185% Formaldehyd mindestens eine Stunde lang (besser über Nacht) fixiert. Waren die Gele zuvor einer Coomassie-Blau-Färbung unterzogen und im Zuge dessen auch fixiert worden, so entfiel dieser Schritt.

Nach der Fixierung wurden die Gele dreimal 20 min in 50% Ethanol gewaschen, anschließend 1 min in einer 0,8 mM Natriumthiosulfat-Lösung vorbehandelt, dreimal 20 sec in

demineralisiertem Wasser gewaschen und schließlich 20 min im Dunkeln in einer Lösung aus 11,8 mM Silbernitrat und 0,028% Formaldehyd in demineralisiertem Wasser imprägniert. Die Entwicklung der Silberkomplexe erfolgte nach zweimaligem Waschen in demineralisiertem Wasser für je 20 sec in einer frisch angesetzten Lösung aus 0,57 M Natriumcarbonat, 0,0185% Formaldehyd und 0,016 mM Natriumthiosulfat. Sobald die Protein-Banden gut erkennbar vorlagen, wurde der Vorgang gestoppt und anschließend mit 50% Ethanol nachgewaschen.

## 2.9 Bestimmung enzymatischer Aktivitäten

Die im folgenden beschriebenen Messungen enzymatischer Aktivitäten wurden spektrophotometrisch bei 25°C durchgeführt. Hierzu diente ein Spektrophotometer (UV-1202, Shimadzu) mit Küvettenautomatik und Kinetik-Software (Kinetics 2, Shimadzu).

### 2.9.1 PEPCK (EC 4.1.1.49)

Die katalytische Aktivität der PEPCK wurde in Richtung der Carboxylierungsreaktion bestimmt, die auf der Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Oxalacetat, bei gleichzeitiger Phosphorylierung von ADP zu ATP, beruht. Sie konnte mit folgendem, über Malat-Dehydrogenase gekoppelten Enzymtest (modifiziert nach JOHNSTON und RAVEN, 1989) nachgewiesen werden.

In einem 1 ml Reaktionsansatz waren enthalten:

100 mM Hepes-NaOH (pH 7), 40 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM ADP, 5 mM PEP, 5 Units MDH, 0,25 mM NADH, sowie 50 µl der Enzymprobe (wenn nicht anders angegeben).

Nach Starten der Reaktion mit PEP wurde die Oxidation des NADH bei 340 nm spektrophotometrisch verfolgt. Die Absorptionsabnahme wurde über einen Zeitraum von 10 min in 60-Sekunden-Intervallen bestimmt. Als Maß für die Enzymaktivität diente die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion (nach einer Temperaturangleichsphase von 60 s).



### 2.9.2 NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym (EC 1.1.1.40)

Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylierungsaktivität des Malat-Enzymes aus *Ectocarpus* - verbunden mit der Bildung von Pyruvat, CO<sub>2</sub> und NADPH - wurde unter Verwendung des folgenden Enzymassays (ursprünglich entwickelt für *Ascophyllum*; persönliche Mitteilung von Andrew Johnston, Department of Biological Sciences, University of Dundee) bestimmt.

In einem Volumen von 1 ml waren:

25 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5), 0,5 mM EDTA, 2,5 mM L-Malat, 0,25 mM NADP<sup>+</sup>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 50 µl Enzym-Probe enthalten.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Malats gestartet. Die Bildung von NADPH wurde als Zunahme der Absorption spektrophotometrisch bei 340 nm, unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.9.1. angegeben, verfolgt.

### 2.10 Western-Blotting

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen zum Zwecke anschließender immunologischer Nachweise sowie N-terminaler Protein-Sequenzierung erfolgte in Anlehnung an das von TOWBIN et al. (1979) entwickelte Tank- bzw. Naß-Blotting-Verfahren, mit welchem - speziell für den Transfer auf PVDF-Membranen - allgemein bessere Transfereffizienzen erzielt werden können als mit dem später von KYHSE-ANDERSEN (1984) entwickelten SemiDry-Blotting-Verfahren (MOZDZNOWSKI et al., 1992).

Abweichend vom Protokoll für das konventionelle Tank-Blotting-Verfahren wurde aufgrund des effizienteren Transfers ein Puffer für kontinuierlichen Transfer nach BJERRUM und SCHAFFER-NIELSEN (1986) verwendet, der üblicherweise beim SemiDry-Elektroblotting Anwendung findet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel zur Reduktion des freien SDS im Gel 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Während dieser Zeit wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran für 1 bis 3 Sekunden in reinem Methanol vollständig benetzt und anschließend zum Entfernen des Methanols für 1 bis 2 Minuten in aqua bidest. gewaschen, bevor auch sie für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert wurde. Das "Gel-Transfermembran-Sandwich" wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale luftblasenfrei nach folgendem Schema zusammengesetzt:

- Perforierte Plexiglasscheibe (Anodenseite)
- 2 Schaumstoffschwammtücher
- 2 Whatman Filterpapiere
- PVDF-Membran
- Polyacrylamid-Gel
- 2 Whatman-Filterpapiere
- 2 Schaumstoffschwammtücher
- perforierte Plexiglasscheibe (Kathodenseite)

Das "Blot-Sandwich" wurde so in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt, dass die Membran zur Anode, das Gel zur Kathode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte bei einer Felstärke von 7,5 V/cm über Nacht in einem auf 16°C temperierten Raum.

### **2.10.1 Färbung von Proteinen auf Blot-Membranen (mit Ponceau S)**

Zur Kontrolle der Transfereffizienz sowie zur vorübergehenden Sichtbarmachung der Position ausgewählter Proteinbanden auf der Blot-Membran erfolgte im Anschluß an das Blot-Verfahren die von SALINOWICH und MONTELARO (1986) entwickelte reversible Färbung mit dem sauren Azofarbstoff Ponceau S nach dem Protokoll von GROLIG et al. (1988). Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer 5 Minuten in aqua dest. gewaschen und anschließend 15 Minuten in Ponceau-Lösung unter leichter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert. Um überschüssigen Hintergrundfarbstoff auf der Membran zu entfernen, wurde mit aqua dest. solange gewaschen, bis nur noch die Proteinbanden rot gefärbt vorlagen. Nach entsprechender Markierung der Referenzproteinbanden bzw. eventuell photographischer Dokumentation wurde die Membran für den späteren immunchemischen Nachweis in TBS vollständig entfärbt (10-20 min).

## **2.11 Protein-Sequenzierung**

Die Identifizierung eines Teilabschnittes der Aminosäuresequenz der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels N-terminaler Sequenzierung (Edman-Abbau) und wurde von PD Dr. René Brunisholz am Institut für Molekularbiologie und Biophysik der ETH-Zürich (Schweiz) durchgeführt.

### 2.11.1 Vorbereitung der Proteine für die Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde sowohl mit dem gereinigten Malat-Enzym (siehe 2.5.2) als auch mit den beiden nach der Reinigung im SDS-Polyacrylamidgel auftretenden Polypeptiden der PEPCK (2.5.1) aus *Ectocarpus siliculosus* vorgenommen.

Sämtliche nachfolgend aufgeführten Schritte wurden ausschließlich unter Verwendung von sterilfiltriertem aqua bidest. durchgeführt.

Die gereinigten Proteine wurden zunächst wie unter 2.8 angegeben in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches, um ein vollständiges Auspolymerisieren zu gewährleisten, vor der Trennung 12 Stunden bei 10°C feucht gelagert wurde. In Abwandlung zum Protokoll unter 2.8 wurde außerdem dem Kathodenpuffer 0,1 M Na-Thioglycolat zugefügt, um im Gel verbliebene freie Radikale und Oxidationsmittel zu beseitigen (JOHN WILEY et al, 2000).

Im Anschluß an die Elektrophorese erfolgte die Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P<sup>SQ</sup> Membran wie unter 2.10 beschrieben. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zur vollständigen Entfernung von Tris- und Glycerinresten des Transferpuffers (sie stören bei der Sequenzierung), neunmal 10 min in je 500 ml aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S (siehe 2.10.1) angefärbt und nach Entfärben des Hintergrundes mit Wasser zwischen Whatman-Papier 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die relevanten Protein-Banden wurden nach dem Trocknen ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesetzt. Für 15 Sequenzierungszyklen wurden je ca. 50 pmol Protein verwendet.

## 2.12 Immunchemischer Nachweis von Antigenen auf Blot-Membranen

### 2.12.1 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktionen müssen vor der Durchführung der Immunreaktionen unspezifische Bindungsstellen für die immunologischen Reagentien auf der Blot-Membran abgesättigt werden. Dies kann entweder mit irrelevanten Proteinen, die keine Reaktion mit den Reagenzien des Immunnachweises eingehen, erreicht werden oder durch nicht-ionische Detergentien, die eine Blockierung der hydrophoben Wechselwirkungen der Reaktanden mit der Membran gewährleisten.

In Anlehnung an BERS und GARFIN (1985) wurde nach dem Protein-Transfer, wie unter 2.10 beschrieben, in Kombination der beiden Blockierungsmethoden eine Block-Lösung verwendet, die sowohl Magermilchpulver als auch Tween<sup>®</sup> 20 enthielt.

Dazu wurde die PVDF-Membran entweder direkt nach dem Transfer und 5-minütigem Waschen in aqua dest. oder nach der Ponceau-Färbung (siehe 2.10.1) 1 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) in Block-Lösung geschwenkt und anschließend zum Entfernen der Magermilchlösung 15 min in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran entweder gleich für die Immundetektion eingesetzt oder zwischen Filterpapier getrocknet aufbewahrt.

### **2.12.2 Binden des Primärantikörpers**

Nach dem Blockieren freier Bindungskapazitäten (2.12.1) wurde die mit TBS-Tween gewaschene bzw. 10 min in TBS-Tween eingeweichte Membran mit dem Primärantikörper (bzw. Präimmunserum als Referenz) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der Antikörper in einer Lösung aus 1% BSA (w/v in TBS-Tween) so verdünnt, dass ein optimales Signal-/Hintergrundverhältnis zustande kam (für jeden Antikörper getrennt ermittelt).

Zur Einsparung von Antikörperlösung erfolgte die Inkubation der Membran nach der im folgenden beschriebenen Methode: Die Blot-Membran wurde in Streifen mit der Transfer-Seite nach oben auf einen wenige cm größeren Parafilm-Streifen (auf Glasplatte) gelegt. Es wurde soviel Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben, dass ein deutlich sichtbarer Flüssigkeitsfilm entstand. Um eventueller Verdunstung vorzubeugen, wurde die Membran mit einer Plastikhaube abgedeckt. Durch vorsichtiges Neigen der so gefertigten Inkubationskammer wurde die Antikörperlösung auf der Membran hin- und herbewegt.

### **2.12.3 Binden des Sekundärantikörpers**

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranstreifen für 10 min in TBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Promega). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:7500 in 1% BSA in TBS-

Tween eingesetzt. Die Inkubation erfolgte nach der gleichen Methode wie für den Primärantikörper (siehe 2.12.2) auf einem Parafilmstreifen.

#### **2.12.4 Detektion der Immunkomplexe auf der Blot-Membran**

Der colorimetrische Nachweis von alkalischer Phosphatase auf der Blot-Membran erfolgte nach der Vorschrift von BLAKE et al. (1984). Dabei dient 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) zusammen mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) als chromogenes Substrat. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat (ein lösliches Leucoindigo) um. Das Indoxylderivat wird durch NBT oxidiert und dimerisiert zu dem tiefblauen, unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo. NBT wird dabei als Wasserstoff-Akzeptor zu einem intensiv purpur gefärbten Diformazan reduziert und verstärkt so die Intensität des Farbniederschlags (FRANCI und VIDAL, 1988).

In Vorbereitung zum colorimetrischen Nachweis wurde die Transfer-Membran nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (2.12.3) dreimal für je 10 min in TBS-Tween und nachfolgend 1 min in TBS sowie 1 min in aqua dest. gewaschen. Auf die Oberfläche der auf einem Parafilmstreifen platzierten Membran wurde dann die frisch angesetzte AP-Substratlösung aufgetragen. Die Entwicklung des blauen Farbniederschlags erfolgte im Dunkeln. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität der (positiven) Signale (ca. 2-10 Minuten) wurde die Reaktion durch Spülen der Membran in TBS mit 20 mM EDTA (Komplexierung der für die Enzymaktivität notwendigen  $Mg^{2+}$ -Ionen) gestoppt. Die Membran wurde schließlich zwischen Filterpapier getrocknet. Eine trockene Membran kann über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, da der Farbniederschlag nahezu nicht ausbleicht.

### **2.13 Antikörperproduktion**

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen Malat-Enzym (56 kDa-Bande) sowie die bei der PEPCK-Reinigung entstehenden Polypeptide (62 und 18 kDa) aus *Ectocarpus siliculosus* wurden Kaninchen nach dem folgenden Protokoll immunisiert.

- Tag 1: Präimmunserum-Entnahme, anschließend 1. Injektion
- Tag 14: 2. Injektion
- Tag 28: 3. Injektion
- Tag 56: 4. Injektion
- Tag 98: 5. Injektion (als Verlängerung des Standardprotokolls)
- Tag 122: Entblutung

Pro Injektion wurden jedem Tier ca. 100 µg des gereinigten Proteins zugeführt. Dazu wurden die Proteine nach der Reinigung (siehe 2.5) in einem 12%-igen SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch getrennt (2.8) und mit Coomassie Blue angefärbt (2.8.1.1). Aus dem mit einer Lösung aus 7% Essigsäure und 30% Ethanol entfärbten Gel wurden die relevanten Banden ausgeschnitten und in dieser Form der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) für die Immunisierung zugesandt.

## 2.14 Reinigung der IgG-Fraktion eines polyklonalen Antikörperserums

Die Antikörperseren wurden, um unspezifische Wechselwirkungen bei immunchemischen Nachweisen zu vermeiden, affinitätschromatographisch mittels Protein G-Agarose gereinigt.

Protein G, ein Zelloberflächenprotein der Streptokokkengruppe G, ist ein Typ III Fc-Rezeptor, der - ähnlich wie Protein A von *Staphylococcus aureus* - mit Hilfe einer nicht-immunen Reaktion an die Fc-Region von IgG bindet.

Sämtliche bei der Reinigung verwendeten Lösungen und Puffer wurden sterilfiltriert und auf 4°C vorgekühlt.

Für die IgG-Reinigung wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung mit dem Antikörperserum durchgeführt (nach HARLOW und LANE, 1988). Dazu wurden 2,4 ml Serum 10 min bei 500×g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung der restlichen unlöslichen Bestandteile für weitere 10 Minuten bei 10000×g und 4°C zentrifugiert. Eine an der Oberfläche gebildete Fettschicht wurde entfernt, die darunterliegenden ca. 2,2 ml Serum vom Pellet getrennt und in einem neuen Gefäß auf Eis 1 Stunde gerührt, während langsam die gleiche Menge einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (3,9 M, 4°C) zugegeben wurde, so dass schließlich eine 50%ige Ammoniumsulfatsättigung resultierte.

Diese Suspension wurde anschließend 10 min bei 10000×g und 4°C zentrifugiert; das Pellet wurde in 2 ml 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) gelöst, nachfolgend 15 min auf Eis gerührt und erneut 10 min bei 10000×g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zum Entsalzen auf eine zuvor mit Na-Phosphatpuffer (20 mM, pH 7.0) äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (8 ml

Volumen, Durchmesser 1,5 cm, Höhe 5 cm) aufgegeben und mit 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) eluiert.

Die weitere Reinigung der IgG-Fraktion des Antikörperserums erfolgte mittels einer an eine Schlauchpumpe (Pump P1, Pharmazia) angeschlossene HiTrap™ Protein G Affinitätssäule (1 ml Gelbett; Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min).

Dazu wurde die aus der Ammoniumsulfatfällung kommende entsalzte Antikörperlösung auf die mit 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) äquilibrierte HiTrap™-Säule aufgetragen. Zum Entfernen ungebundener Proteine wurde die Säule anschließend mit mindestens zehn Säulenvolumina des Natriumphosphatpuffers gewaschen.

Die darauffolgende Elution der IgG-Fraktion erfolgte mit fünf Säulenvolumina 0,1 M Glycin/HCl-Puffer (pH 2.7), wobei das Eluat in 0,5 ml-Fractionen in Reaktionsgefäßen gesammelt wurden, in denen je 50 µl 1 M Tris/HCl-Puffer (pH 9.0) zur Neutralisation vorgelegt worden waren, um eine Denaturierung der Proteine im sauren Elutionspuffer zu verhindern. Anhand des angefertigten Elutionsprofils (Messung der Absorption bei 280 nm) wurden IgG-reiche Fraktionen vereinigt und anschließend mit Hilfe eines Centriprep® 10-Konzentrators (3×15 min, 3000×g, 4°C) auf 900 µl ankonzentriert. Die folgende Umpufferung des Konzentrates in 3 ml PBS-Puffer erfolgte wie oben an einer Sephadex G-25 Säule.

Die so gereinigte, umpufferungsfähige IgG-Fraktion wurde portioniert bei -20°C gelagert.

Zur Überprüfung der Effektivität der Reinigung wurde der Proteingehalt der gereinigten IgG-Fraktion bestimmt (siehe 2.7). Außerdem erfolgte eine Analyse der gereinigten IgG-Fraktion mittels SDS-PAGE.

## 2.15 Immunochemische Assays

Die Reaktivität der erzeugten Antiseren wurde durch Immuno-Präzipitation des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms sowie der PEPCK in 0-55% bzw. 55-80% ammoniumsulfatgefälltem Extrakt aus *E. siliculosus* bestimmt. Dazu wurde das fraktioniert gefällte Rohextraktprotein in PBS gelöst und mit seriell unterschiedlichen Verdünnungen des entsprechenden Antikörpers (gereinigte IgG-Fraktion) in PBS (Endvolumen 300 µl) 20 min bei 18°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Protein A-Suspension zugegeben und der Ansatz für weitere 20 min unter vorsichtigem Schütteln bei 18°C inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation (8000×g, 10°C) wurde der Überstand in den jeweiligen Enzym-Assay (Endvolumen 1 µl) eingesetzt und eine Aktivitätsbestimmung, wie unter 2.9 angegeben, durchgeführt.

Für Immuninhibitionsstudien wurde die Enzym-Aktivität von PEPCK bzw. NADP<sup>+</sup>-ME in Anwesenheit unterschiedlich konzentrierter Antikörperlösungen ermittelt. Dazu wurde fraktioniert gefälltes Rohextraktprotein (0-55% AS für ME; 55-80% für PEPCK) mit Antikörperlösungen unterschiedlicher Konzentration 30 min bzw. 1 Stunde bei 18°C inkubiert und anschließend in den entsprechenden Enzym-Assay eingesetzt.

## **2.16 Immuncytochemische Lokalisation verschiedener Proteine in *Ectocarpus siliculosus* und *Pylaiella littoralis***

Der intrazelluläre Nachweis und die Lokalisation verschiedener Proteine von *Ectocarpus siliculosus* bzw. *Pylaiella littoralis* mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Dazu mussten die vegetativen Braunalgencellen zunächst fixiert werden (um einer durch die spätere Behandlung der Zellen bedingte Zerstörung / Änderung der Zellstruktur weitestgehend vorzubeugen).

### **2.16.1 Fixierung der Zellen**

Die Fixierung erfolgte in einer Lösung aus 3% Formaldehyd und 5% Methanol in PES/aqua dest. (1:2). Die direkt aus der Kultur entnommenen Algen (ca. 15-20 mg Frischgewicht) wurden dabei locker in das Fixierungsmedium in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingegeben und 30 min unter vorsichtigem Schütteln auf Eis inkubiert. Der Zusatz von Methanol in Fixierungsmedien dient der Permeabilisierung von Membranen (KNOX, 1982). Anschließend wurden die fixierten Zellen dreimal in je 1,5 ml PES/aqua dest. (1:2) gewaschen.

### **2.16.2 Aufbrechen der Zellen**

Die mit der Waschlösung gut benetzten Algen wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß übertragen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurden sie sofort mit einem Metallstab so zerstoßen, dass sie möglichst schonend aufgebrochen vorlagen.



### **2.16.3 Inkubation mit primärem Antikörper**

Die geöffneten Algenzellen wurden leicht angetaut, bevor sie in einer Lösung aus 1% BSA mit dem verdünnten primären Antikörper in PES/aqua dest. (1:2) versetzt wurden.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte 45 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis. Danach wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml PES/aqua dest. (1:2) gewaschen, wobei jeweils nach einer einminütigen Zentrifugation bei 2000×g der Überstand verworfen wurde, die Algen in der Waschlösung kurz vorsichtig geschüttelt und wieder zentrifugiert wurden.

### **2.16.4 Inkubation mit sekundärem Antikörper**

Anschließend an den letzten Waschschrift erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper. Als sekundäre Antikörper wurden ein FITC-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:100) bzw. ein Cy<sup>TM</sup> 2-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG Antikörper (Verdünnung 1:150) eingesetzt. Wie bei dem Primärantikörper wurde auch hier der Antikörper in einer Lösung aus 1% BSA in PES/aqua dest. (1:2) verdünnt. Die Inkubation der Zellen in dieser Lösung erfolgte 30 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis.

### **2.16.5 Einbettung der Zellen**

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Algenzellen wie bereits unter 2.16.3 beschrieben dreimal gewaschen. Das Algenzellen-Pellet aus dem letzten Zentrifugationsschritt wurde in 50 µl PES/aqua dest. (1:2) aufgenommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach leichtem Antrocknen des Ausstrichs wurden 40 µl eines Einbettungsmediums (3.16.6) aufgetragen, in das die Zellen luftblasenfrei eingemischt wurden. Abschließend wurde ein mit Vaselinefüßchen versehenes Deckglas aufgelegt. Nach 12-stündiger Inkubationszeit im Dunkeln konnte das Präparat mikroskopisch analysiert werden.

### 2.16.6 Herstellung des Einbettungsmediums

Die Einbettung von Immunfluoreszenz-Präparaten erfolgte in einer mit 0,1 % p-Phenylendiamin versetzten Mowiol-Glycerin-Lösung nach GROLIG et al. (1988). Dabei diente rekristallisiertes p-Phenylendiamin zur Verminderung des Ausbleichens der Immunfluoreszenz während der Mikroskopie (JOHNSON und NOGUERA ARANJO, 1980). Die Rekristallisation erfolgte, indem 3 g p-Phenylendiamin in 50 ml 1 M HCl bei 25°C gelöst, nach Zugabe von 1 g aktivierter Holzkohle 2 h gerührt und anschließend durch einen Whatman-Filter filtriert wurden. Das Filtrat wurde auf Eis gekühlt, mit 35 ml kalter (4°C) HCl versetzt und unter Bildung weißer Kristalle 6 Stunden bei 4°C gehalten. Die mit Hilfe eines Büchner-Tichters vereinigten Kristalle wurden in aqua bidest. gelöst (1 % w/v) bei -20°C aufbewahrt.

Für die Mowiol-Glycerin-Lösung wurden zu 6 g Glycerin 2,5 g Mowiol 4-88 zugegeben und 1 h gerührt, bevor nach Zugabe von 6 ml aqua dest. erneut 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die Zugabe von weiteren 12 ml eines 0,2 M Tris/HCl-Puffers (pH 8.5) und das gelegentliche Rühren während einer 10-minütigen Inkubation bei 50°C (Wasserbad) diente dem vollständigen Lösen des Mowiols. Die Lösung wurde durch Zentrifugation (5000×g, 15 min, Raumtemperatur) geklärt und konnte so bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Herstellung des p-Phenylendiamin/Mowiol-Einbettungsmediums wurde unmittelbar vor Gebrauch 150 µl 1%iges p-Phenylendiamin mit 850 µl der Mowiol-Glycerin-Lösung vermischt, zum Entfernen der Luftblasen kurz zentrifugiert (10000g, 30 sec, Raumtemperatur) und bis zum Verbrauch auf Eis gehalten.

## 2.17 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Die Kontrolle und Dokumentation Immuncytochemischer Lokalisationsversuche an den Algenzellen erfolgte mit Hilfe konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie. Sämtliche konfokalen Aufnahmen wurden an einem TCS SP2 von Leica gemacht, wobei ausschließlich das 40-er HCX OL APO-Objektiv mit Ölimmersion (NA 1,32) eingesetzt wurde. Für die Anregung von FITC- bzw. Cy<sup>TM</sup> 2 markierter Strukturen wurde ein Argon 65 mW (457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm)-Laser eingesetzt, der stets auf minimaler Stufe betrieben wurde.

Alle Bilder entstanden mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixeln in Kombination mit einem Line-Average von 4 bis 16.

## 2.18 Nachweis acider Kompartimente mit Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure

Zur Lokalisation acider intrazellulärer Zellbereiche in *E. siliculosus* wurde der pH-sensitive Fluoreszenz-Farbstoff Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure (CDFF) verwendet. Mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von ~5 ist dieser Farbstoff zum Nachweis mäßig saurer Bereiche geeignet. Da das geladene Farbstoffmolekül in der Regel nicht durch Zellmembranen permeiert, wurde in den Versuchen ein ungeladenes Diacetat-Ester-Derivat (Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure Diacetat Ester (CDFFDA)) des CDFF eingesetzt.

Innerhalb der Zelle katalysieren unspezifische Esterasen die Spaltung der Esterbindung und gewährleisten so die Freisetzung des Farbstoffmoleküls. Dieses ist geladen und kann deshalb die Zelle nicht mehr verlassen, so dass es zu einer Anreicherung in der Zelle kommt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur in einem Ansatz aus 10 mM Bis-Tris-Propan/HCl (pH 7.8) in Seewasser, dem Etoxyzolamid in einer Konzentration von 40 µM sowie CDFFDA in einer Endkonzentration von 20 µM zugesetzt waren. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde in Seewasser gehalten, um Reste des Inkubationsmediums von der Zelloberfläche zu entfernen.

Die Zugabe von Ethoxyzolamid, einem Membran-permeablen Carboanhydraseinhibitor (MORONEY et al., 1985), sollte verhindern, dass externe und interne Carboanhydrasen, die auch Esterase-Aktivität besitzen, eine Spaltung der Esterbindung des Farbstoff-Konjugates auslösen, bevor dieses entsprechende Membranen passieren konnte. Ohne Inhibitorzugabe wurde der größte Teil des veresterten Farbstoffs extrazellulär hydrolysiert, so dass der Farbstoff nicht in ausreichenden Konzentrationen akkumulierte.

Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Laser-Scan-Mikroskop TCS SP2 (Leica) unter Einsatz des 40-er HCX PL APO-Objektivs mit Ölimmersion (NA 1,32). Zur Anregung von CDFFDA wurde ein Argon 65 mW (488 nm)-Laser verwendet. Es wurde eine Bildauflösung von 1024×1024 Pixeln in Kombination mit einem Line Average von 16 gewählt.

## 2.19 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.19.1 Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. siliculosus* erfolgte in Anlehnung an das von PEARSON et al. (2001) für *Fucus vesiculosus* entwickelte Protokoll zur RNA-Extraktion. Diese Methode nutzt das Prinzip der sauren Phenol-Chloroform-Extraktion, welches darauf beruht, dass bei pH-

Werten unter pH 7.0 (maximaler Effekt bei pH 4.5) neben Proteinen auch DNA von Phenol-Chloroformgemischen gefällt wird und sich wie die Proteine in der Interphase ansammelt, während RNA in der wässrigen Phase zurückbleibt.

Direkt aus der Kultur entnommene Algen wurden zunächst mit kaltem Leitungswasser in einem Sieb abgespült und mit Zellstofftüchern abgetupft, um PES-Rückstände von der Zelloberfläche zu entfernen. Direkt anschließend wurden die Algen in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben.

Zu je 150 mg Algenpulver wurden 750 µl RNA- Extraktionspuffer zugegeben und 20 min lang bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Anschließend wurde extrahiert, indem nacheinander je 77 µl 1,5 M Na-Acetat (pH 4.0) und ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) beigemischt wurden. Die Phasentrennung dieses Gemisches erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 10000×g (Raumtemperatur). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit dem 0,3-fachen Volumen Ethanol vermischt. Nach Zentrifugation (10000×g, 5 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand von einem weißen Pellet aus Polysacchariden und einem Großteil der DNA getrennt und mit 1 Volumen Chloroform durch kräftiges Schütteln und anschließende Zentrifugation (10000×g, 20 min, Raumtemperatur) extrahiert.

Die obere wässrige Phase wurde zur RNA-Fällung mit 0,25 Volumen 12 M LiCl und Mercaptoethanol (Endkonzentration 1 %) versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach Zentrifugation (10000×g, 30 min, 4°C), Waschen des Pellets mit 1 ml 75% Ethanol und erneuter Zentrifugation (10000×g, 5 min, 4°C) wurde die RNA in 100 µl aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurde einmal mit 10 µl 1,5 M Na-Acetat (pH 4.0) sowie 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) jeweils durch Schütteln und anschließendem Zentrifugieren (10000×g, 20 min, 4°C) zur Phasentrennung extrahiert.

Zum Konzentrieren der RNA wurde die wässrige Phase mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,5) und 2 Volumen Ethanol versetzt und 6 Stunden bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (10000×g, 30 min, 4°C), Waschen des Pellets mit 75% Ethanol, erneuter Zentrifugation (10000×g, 5 min, 4°C) und anschließendem Trocknen an der Luft wurde das RNA-Pellet in aqua bidest. (15 µl/1 g Ausgangsmaterial) gelöst und bei -73°C gelagert.

### 2.19.2 Isolierung von Poly-A<sup>+</sup>-mRNA

Die Anreicherung von Poly-A<sup>+</sup>-RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit dem Oligotex™ mRNA Mini Kit (Qiagen). Die Trennung der polyadenylierten mRNA von anderen RNA-Spezies wurde dabei mittels Affinitätschromatographie an kovalent an eine Latexmatrix gebundenen Oligo-dT-Nukleotiden nach dem *Spin-Column* Protokoll durchgeführt.

Die mit 100 µl aqua bidest. von der Oligotex-Säule eluierte Poly-A<sup>+</sup>-mRNA wurde durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (pH 5.5) und 2,5 Volumen Ethanol 4 h bei -20°C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (10000×g, 30 min, 4°C), Waschen des Pellets mit 75% Ethanol, erneuter Zentrifugation (10000×g, 5 min, 4°C) und dem Trocknen des Pellets an der Luft wurde die RNA in aqua bidest. gelöst und konnte bei -73°C gelagert werden.

### 2.19.3 Plasmid-DNA-Minipräparation

Es wurden Präparationen ausgehend von 2 ml *E. coli*-Übernachtskultur nach der alkalischen Lysemethode von BIRNBOIM (1983) durchgeführt.

Die pelletierten *E. coli*-Zellen (15000×g, 1 min, Raumtemperatur) wurden in 100 µl GTE-Lösung, versetzt mit 15 µg DNase-freier RNase A, vollständig resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die folgende Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH/1% SDS (vorsichtig durchmischt) führte während 5 min Inkubation auf Eis zur Denaturierung bakteriellen Proteins durch SDS sowie chromosomaler und plasmidärer DNA durch NaOH. Zur anschließenden Neutralisation (5 min auf Eis), die mit der Renaturierung der Plasmid-DNA einhergeht, wurden 150 µl einer 5 M Kalium-Acetat-Lösung (pH 4,8) zugemischt. Dabei fielen chromosomale DNA, bakterielle Proteine sowie komplexiertes Kalium/SDS aus. Sie wurden durch Zentrifugation (15000×g, 5 min, Raumtemperatur) mit den bakteriellen Zellbruchstücken pelletiert. Der klare Überstand (ca. 400 µl, SDS-Flocken-frei) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurde 1 ml 100% EtOH (-20°C) zugemischt. Die Plasmid-DNA fiel während einer 2-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur aus. Die anschließende Zentrifugation (15000×g, 3 min, Raumtemperatur) ergab ein DNA-Pellet, welches mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen wurde. Nach erneuter Zentrifugation (15000×g, 1 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 25 µl EB gelöst. Diese DNA-Präparation wurde bei 4°C bzw. bei -20°C aufbewahrt.

## 2.20 Konzentrations-, Grössen- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

### 2.20.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Der Gehalt von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde spektrophotometrisch anhand der Extinktion der entsprechenden Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Dabei gilt:  $c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$

wobei: OD = optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (= 50 für dsDNA, da:  $A_{260} = 1 \cong 50 \mu\text{g/ml}$  für DNA;

40 für RNA, da:  $A_{260} = 1 \cong 40 \mu\text{g/ml}$  für RNA)

Außerdem erhält man aus dem Verhältnis der  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  zu der  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. So weisen proteinfreie Nukleinsäurelösungen, abhängig von Gesamtbasenzusammensetzung und Sekundär-Strukturen, ein Extinktions-Verhältnis von 1,8 - 2,0 auf.

Um mögliche Messungenauigkeiten zu vermeiden, die sich aus pH- und Salzgehaltsschwankungen in ungepuffertem Wasser ergeben, wurde die OD-Messung in einem 2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 8.5) durchgeführt (WILFINGER et al., 1997).

### 2.20.2 Mengen- und Größenbestimmung im Agarosegel

Die ungefähre Menge und Konzentration von Nukleinsäuren in Agarosegelen (siehe 2.22) konnte durch Auftragen eines "Markers" definierter Menge und bekannter Fragmentlänge abgeschätzt werden.

Für DNA wurde der  $\lambda$ -DNA /EcoR I, Hind III-Marker (Fragmentlängen: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 bp) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde die aufgetragene DNA-Menge abgeschätzt, indem die Fluoreszenzintensität der einzelnen Banden des Markers mit denen der DNA-Probe verglichen wurde.

Zur Bestimmung der Länge von RNA-Fragmenten wurde eine RNA-"Leiter" (High Range) (Fragmentlängen: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200 Basen) eingesetzt.

## 2.21 Verdau mit Restriktionsenzymen

Zur Größenbestimmung von isolierter Plasmid-DNA (2.19.3) wurde diese mit Typ II Restriktionsendonukleasen verdaut. In einem 20 µl Ansatz wurden dabei 2 Units Restriktionsendonuklease pro µg zu spaltender DNA eingesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde zur Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von DNA-Probenpuffer und 15 min Inkubation bei 65°C gestoppt. Die Analyse erfolgte durch Gelelektrophorese (siehe 2.22.1).

## 2.22 Elektrophorese von Nukleinsäuren

### 2.22.1 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten, deren Größenbestimmung sowie die Kontrolle der Reinheit und Konzentration von DNA-Proben erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Für analytische und präparative Zwecke wurde die Elektrophorese in horizontalen 1%igen Agarose-Gelen der Größe 150 mm × 100 mm × 8 mm durchgeführt.

Für 110 ml Agarosegellösung wurden 1,1 g Agarose in siedendem 1x TBE-Puffer gelöst, auf 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt.

Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt (1 µl 10x PP zu 9 µl DNA-Probe) 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Referenz diente 1 µg Größenstandard-DNA.

Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE-Puffer bei einer Spannung von 100 bis 150 V durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die getrennten DNA-Fragmente durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht mit einem UV-Transilluminator ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

### 2.22.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Die Trennung von RNA-Fragmenten, deren Größenbestimmung sowie die Kontrolle der Reinheit und Konzentration von RNA-Proben erfolgte durch Elektrophorese in horizontalen 1%igen Agarosegelen (100 mm × 60 mm × 8 mm) unter denaturierenden Bedingungen. Zur

Inaktivierung von RNasen wurde die Gelapparatur 20 min mit 0,1 M NaOH sowie 5 min mit 3% Wasserstoffperoxidlösung behandelt und nachfolgend gründlich mit aqua bidest. gespült.

Die Herstellung des Agarosegels erfolgte, indem die entsprechende Menge Agarose in siedendem aqua bidest. gelöst, anschließend auf 60°C abgekühlt und mit 20x MOPS-Puffer und einer 37%igen Formaldehydlösung zu einer Endkonzentration von 1x MOPS-Puffer und 6,6 % Formaldehyd versetzt wurde.

Die in aqua bidest. gelösten RNA-Proben wurden mit 1 Volumen RNA-Denaturierungspuffer versetzt und 15 min bei 68°C inkubiert (danach sofort auf Eis gehalten). Nach Zugabe von 1/5 des Endvolumens eines Bromphenolblau (100 mg/ml)-Ethidiumbromid (1mg/ml)-Gemisches wurde die RNA-Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei einer angelegten Feldstärke von 7-9 V/cm. Nach beendeter Trennung wurde die RNA durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

### 2.23 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus nichtdenaturierenden Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoTrap<sup>®</sup> Nucleic Acid Purification Kit (Clontech) nach Angabe des Herstellers.

Die aus dieser Präparation resultierende DNA wurde in anschließenden Klonierungsreaktionen eingesetzt.

### 2.24 3'-RACE-PCR-Amplifikation

Die "schnelle Amplifikation von cDNA-Enden" (RACE) mittels PCR (FROHMAN et al., 1988) stellt eine Alternative zur meist zeitaufwändigen Erstellung und dem anschließenden *Screening* einer cDNA-Bank bei der Suche nach einer bestimmten cDNA dar.

Ausgehend von Poly-A<sup>+</sup>-RNA erfolgt dabei die cDNA-Synthese durch Reverse Transkription unter Einsatz eines modifizierten Oligo-dT-Primers. Dieser trägt neben der Poly-T-Sequenz die Annealing-Sequenz ("SMART-Sequenz") des in der anschließenden PCR eingesetzten "antisense"-Primers.



### 2.24.1 cDNA-Erststrangsynthese

Die Synthese der 3'-RACE cDNA erfolgte mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), basierend auf der von CHENCHIK et al. (1996, 1998) entwickelten, simplifizierten Methode der "schnellen Amplifikation von cDNA-Enden".

Dabei wurde zunächst 1 µg der isolierten Gesamt- oder Poly-A<sup>+</sup>-RNA (3.16.1, 3.16.2) aus *Ectocarpus siliculosus* mit 1 µl 3'-cDNA-Synthese-Primer (10 µM) - mit aqua bidest. auf 5 µl Endvolumen aufgefüllt - 2 min bei 70°C inkubiert, und dann weitere 2 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden 5 µl 5x RT-Puffer, 1 µl einer 20 mM DTT-Lösung sowie 1 µl eines 10 mM dNTP-Gemisches und schließlich 1 µl PowerScript™ Reverse Transkriptase zugegeben. Nach kurzer gründlicher Durchmischung wurde dieser Ansatz 1,5 h bei 42°C in einem Luftinkubator gehalten.

Die synthetisierte cDNA wurde mit 250 µl (bei Start mit Poly-A<sup>+</sup>-RNA) bzw. 100 µl (bei Start mit Gesamt-RNA) Tricin-EDTA-Puffer verdünnt und für 7 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei -20°C aufbewahrt.

### 2.24.2 3'-RACE-PCR

Die Amplifikation der 3'-DNA-Enden in der PCR erfolgte, ausgehend von cDNA als Template (1,25 µl des Erststrangsynthesereaktionsgemisches (2.24.1)), in 25 µl PCR-Reaktionsansätzen, die in folgender Zusammensetzung eingesetzt wurden:

20 mM Tris/HCl (pH 8,9), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % DMSO, 0,2 mM dNTP-Mix und 0,1 mg/ml BSA. Zusätzlich wurde Betain in einer Endkonzentration von 1 M zugefügt, welches neben einem denaturierenden Effekt auf GC-reiche DNA-Bereiche außerdem die Thermostabilität von Proteinen erhöht (WEISSENSTEINER und LANCHBURY, 1996). Neben dem SMART-Primer wurde der genspezifische Primer eingesetzt, beide in einer Endkonzentration von 0,3 µM. Die Reaktion wurde mit einer Kombination aus *Pfu*- und *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt (1 µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix). Die Verwendung dieser beiden Enzyme im Verhältnis 1:11 ermöglicht zum einen, aufgrund der 3'-5' Exonukleaseaktivität der *Pfu*-Polymerase, die Amplifikation langer DNA-Templates (BARNES, 1994). Zum anderen können die so amplifizierten Produkte aufgrund der terminalen Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase direkt in anschließende TA-Klonierungen eingesetzt werden.

### 2.24.2.1 Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen ("Primerdesign")

Ausgehend von der durch N-terminale Sequenzierung ermittelten Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteinuntereinheiten bzw. Fragmente wurden degenerierte Primer konstruiert. Sequenzen, bei denen eine Aminosäure durch Triplets codiert wurde, die sich u.a. auch in den ersten beiden Codon-Positionen unterschieden, wurden nicht zur Herstellung der Primer herangezogen. Traten in der dritten Codon-Position zwei oder drei variable Basen auf, so wurde an dieser Stelle Inosin eingeführt (MARTIN et al., 1985).

Es wurden sowohl genspezifische Primer gestaltet, deren Schmelzpunkt über dem des SMART-Primers lag, um "Touchdown-PCR" zu ermöglichen und so ein unspezifisches Binden des SMART-Primers während der ersten Amplifikations-Runden zu unterbinden (DON et al., 1991; ROUX, 1995) als auch Primer mit zum SMART-Primer möglichst ähnlicher Schmelztemperatur. Die ungefähre Schmelztemperatur wurde nach folgender Formel ermittelt (MWG-Biotech, Ebersberg):

$$T_m = 69,35 \text{ °C} + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 650/L$$

wobei: L = Länge des Primers (Anzahl der Basen)

Grundsätzlich sollten die Primer eine Länge von 23-28 Nukleotiden nicht unter- bzw. überschreiten; der GC-Gehalt sollte möglichst ausgeglichen mit dem SMART-Primer zwischen 50 - 70 % liegen.

Desweiteren wurden die folgenden Kriterien beim "Primerdesign" berücksichtigt:

- Vermeidung von Homopolymerbereichen (> 4 Nukleotide)
- Vermeidung von internen "Haarnadel"-Sequenzen
- Vermeidung komplementärer Sequenzen, die zur Primerdimerisierung führen können.

## 2.25 Klonierung von PCR-Produkten

Die Einführung eines in der PCR amplifizierten DNA-Fragmentes in einen für die anschließende Transformation geeigneten Vektor erfolgte durch TA-Klonierung. Diese Methode basiert auf der Beobachtung, dass Polymerasen ohne "proofreading"-Aktivität über eine terminale Transferase-Aktivität verfügen, mit welcher in den meisten Fällen ein unspezifischer Überhang von einer Base - in den meisten Fällen ein Adenosin (HU, 1993; COSTA und WEINER, 1994) - an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt wird (CLARK, 1988).

In dieser Form modifizierte PCR-Produkte lassen sich effizient in einen komplementär mit Thymin-Überhang konstruierten Vektor ligieren (MARCHUCK et al., 1991).

Die im folgenden dargelegte Klonierung der aus Agarosegelen isolierten PCR-Produkte erfolgte mit dem TOPO™ TA® Cloning Kit in den pCR®2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen). Dabei wird die Ligation durch eine kovalent über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung an den pCR®-TOPO-Vektor gebundene *Vaccinia*-Topoisomerase I katalysiert (SHUMAN, 1994).

Für die Ligation wurden 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (2.23) mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl + 0,06 M MgCl<sub>2</sub>), 3 µl aqua bidest. sowie 1 µl pCR®-TOPO-Vektor vermischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.25.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (Stamm DH5α) erfolgte ausgehend von 3 ml einer Bakterienvorkultur ( $OD \cong 2,5$ ). Mit dieser wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} \cong 0,6$  bei 37°C unter Schütteln angezogen. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (2500×g, 10 min, 4°C), das Pellet in 16 ml eiskaltem T-Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis gehalten und zentrifugiert (2500×g, 10 min, 4°C). Das entstehende Pellet wurde abschließend in 4 ml eiskaltem T-Puffer, versetzt mit 7% (Endkonzentration) DMSO, resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -70°C gelagert.

### 2.25.2 Transformation

Für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Stamm DH5α) wurden 2 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.25) zu 100 µl kompetenter Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, bevor sie für weitere 2 min auf Eis gehalten wurden. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurde unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz 2 min bei 5000×g (Raumtemperatur) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl frischem SOC-Medium resuspendiert. Je 100 µl davon wurden auf eine auf 37°C vorgewärmte, mit 50 µl X-Gal-Lösung behandelte LB-Agar Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht (16-20 h) bei 37°C inkubiert.

Bakterienkolonien, in denen das LacZ-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragmentes zerstört war, blieben aufgrund fehlender  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität weiß, während Klone ohne Insertion eine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase exprimierten und sich folglich blau färbten. Weiße Kolonien wurden in je 3 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (50  $\mu$ g/ml), überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Von den Übernachtskulturen wurden Plasmid-Minipräparationen (2.19.3) durchgeführt und diese durch Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein entsprechender Inserts überprüft (2.21).

## 2.26 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA wurde von Dr. Stefan Zauner, AG Maier, FB Biologie, Universität Marburg, durchgeführt.

Pro Sequenzierungsreaktion wurde je 1  $\mu$ g in aqua bidest. gelöste Plasmid-DNA (3.16.3) bereitgestellt. Zur Sequenzierung wurde unter Verwendung des Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia, Freiburg) sowie IRD700- bzw. IRD800-markierten Sequenzierprimern der Li-COR 4200 Sequenzierautomat (MWG, Ebersberg) eingesetzt.

Die Auswertung der so erhaltenen DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm *ClustalX* (JEANMOUGIN et al., 1998) zur automatischen Erstellung von Alignments. *GeneDoc* (NICHOLAS und NICHOLAS, 1997) wurde zum manuellen Editieren der Alignments verwendet. Sequenzvergleiche sowohl auf Nukleinsäure-, als auch auf Aminosäure-Ebene wurden mit *BlastN* bzw. *BlastX* durchgeführt (ALTSCHUL et al., 1997; Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Reinigung von Enzymen aus *Ectocarpus siliculosus*

Die Trennung der Enzyme PEPCK und NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus dem Rohextrakt von *Ectocarpus siliculosus* erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung. Dabei wurde die NADP-ME-Aktivität mit der ersten Fällungsstufe bei 55% Ammoniumsulfat-Sättigung vollständig präzipitiert. Mit dem darauffolgenden zweiten Fällungsschritt (55-80% Sättigung) wurde die gesamte PEPCK-Aktivität vereinigt.

Neben der Trennung von dem NADP<sup>+</sup>-ME konnte die PEPCK auf diese Weise auch von Pyruvat-Kinase- und Lactat-Dehydrogenase-Aktivität separiert werden. Dieser Punkt erwies sich insbesondere für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der PEPCK als bedeutend, da Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase mit dem PEPCK-Assay interferierten, wenn sie mit dem Rohextrakt oder als Bestandteil gefällten Gesamtproteins (0-80% AS) zugegeben wurden. In Anwesenheit von PEP verursachten die beiden Enzyme in diesem Fall eine photometrisch nachweisbare Oxidation von NADH, die, im Gegensatz zur PEPCK-katalysierten Reaktion, CO<sub>2</sub>-unabhängig erfolgte.

Zur Vermeidung dieser interferierenden Nebenreaktionen wurden PEPCK-Aktivitätsbestimmungen im einfachsten Fall mit fraktioniert gefällten oder aber weiter aufgereinigten Extrakten durchgeführt.

#### 3.1.1 Reinigung von PEPCK

Die durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung teilgereinigte PEPCK aus *E. siliculosus* wurde unter Anwendung eines Vier-Stufen-Protokolls ca. 170-fach aufgereinigt (Tab. 3.1). Das Protokoll umfasste eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex<sup>®</sup>G-100, gefolgt von einem Chromatofokussierungsschritt und einer weiteren Ionenaustauschchromatographie an einer Resource<sup>™</sup> Q-Säule sowie abschließender HPLC-gestützter Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration). Basierend auf den Daten der Proteinreinigung ergab sich für die PEPCK aus *E. siliculosus* ein Anteil von ca. 0,57% am Gesamtgehalt des löslichen zellulären Proteins.

**Tabelle 3.1:** Reinigung von PEPCK aus *Ectocarpus siliculosus*.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Rohextrakt	155	3,5	0,023	100	1
55-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	48,5	2,5	0,052	71	2,3
Sephadex G-200	25,8	0,8	0,031	23	1,4
Chromatofokussierung	0,89	0,5	0,56	14,2	24
Resource™ Q (HPLC)	0,18	0,13	0,71	3,7	31
Gelfiltration (HPLC)	0,007	0,028	4	0,8	174

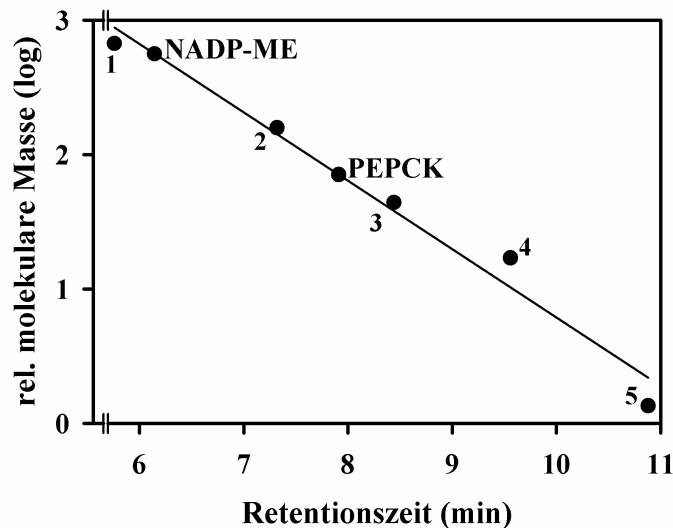
Pro Extraktion wurden ca. 20 g Algenmaterial (Frischgewicht) eingesetzt.

**Abb. 3.1a:** Elutionsdiagramm von PEPCK aus teilgereinigtem Extrakt von *E. siliculosus* von einer Resource™ Q-Säule in der HPLC. Im angelegten linearen KCl-Gradienten eluierte die Enzymaktivität bei einer KCl-Konzentration von 0,05 M.

**Abb. 3.1b:** Größenausschlusschromatographie an einer BioSil® Sec-Säule zur Isolierung von PEPCK aus einem vorgereinigten Proteingemisch aus *E. siliculosus*. Die Elution der PEPCK-Aktivität erfolgte nach ca. 7,9 min. Dies entspricht einer rel. molekularen Masse von ca. 90 kDa für das native Enzym.

Der effizienteste Reinigungsschritt konnte durch Chromatofokussierung an PBM™ 94 erzielt werden. Bei einem absteigenden pH-Gradienten von pH 9.4 bis pH 6.0 eluierte die PEPCK vor dem Hauptanteil aller anderen Proteine bei einem apparenten isoelektrischen Punkt von pH 6.8. Die anschließende Elution der PEPCK von der Resource™ Q-Säule ergab einen distinkten, prominenten Peak bei einer KCl-Konzentration von ca. 0,05 M (Abb. 3.1a). Gleichzeitig mit der Gelfiltration als letztem Reinigungsschritt (Abb. 3.1b) erfolgte die Bestimmung des Molekulargewichts ( $M_r$ ) der nativen PEPCK, für die anhand von Vergleichsproteinen ein Wert

von 90 kDa ermittelt wurde (Abb. 3.2). Bei erneuter Aufgabe der aktiven Fraktionen auf die Gelfiltrationssäule ergaben sich zusätzliche Elutionspeaks geringerer molekularer Masse (bei ca. 30 und 18 kDa). Dies ging mit dem Verschwinden des 90 kDa Peaks und dem Verlust der enzymatischen Aktivität einher.



**Abb. 3.2:** Bestimmung der apparenten molekularen Masse nativer PEPCK und des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* anhand der Größenausschlusschromatographie an einer HPLC-betriebenen BioSil® Sec 250-5 Säule.

Vergleichsproteine waren:

- 1: Thyroglobulin, 670 kDa
- 2: Rinder IgG, 158 kDa
- 3: Hühner Ovalbumin, 44 kDa
- 4: Pferde Myoglobin, 17 kDa
- 5: Vitamin B<sub>12</sub>, 1,35 kDa

Nach der Trennung des nativen 90 kDa Proteins durch SDS-Gelelektrophorese zeigte sich eine Bande mit  $M_r$  62 kDa sowie eine prominentere Bande mit 18 kDa (siehe Abb. 3.3). Außerdem konnte gelegentlich eine schwache Bande im Bereich von 30 kDa nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der relativen molekularen Masse der im denaturierenden SDS-Gel getrennten Polypeptide erfolgte anhand einer Regressionsgeraden, ermittelt aus dem Verhältnis des Logarithmus der relativen molekularen Masse von Standardproteinen (66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2 kDa) zu ihrer jeweiligen Laufstrecke im Gel (ohne Abbildung).

**Abb. 3.3:** SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Reinigung von PEPCK aus *E. siliculosus*. Die mittels SDS-PAGE in einem 12%igen Gel getrennten Proteine wurden mit Silbernitrat gefärbt.

Spur M: Vergleichsproteine

Spur 1 : Präzipitat nach Ammoniumsulfat-Fällung (55-80% Sättigung)

Spur 2 : Aktive Fraktionen nach Chromatofokussierung

Spur 3 : Aktive Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie an Resource™ Q

Spur 4 : gereinigte PEPCK nach Gelfiltration an einer BioSil® Sec 250-5 Säule mittels HPLC

### 3.1.2 Reinigung des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms

**Tabelle 3.2:** Reinigung von NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus *Ectocarpus siliculosus*.

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Rohextrakt	164	1,5	0,0091	100	1
55-80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70,4	0,6	0,011	40	1,2
Sephadex G-200	54,8	1,0	0,018	67	2
Red Sepharose <sup>®</sup> CL-6B	1,8	0,49	0,27	33	30
Resource <sup>™</sup> Q (HPLC)	0,048	0,094	1,97	25,5	216
Gelfiltration (HPLC)	0,007	0,041	5,65	2,75	620

Pro Extraktion wurden ca. 20 g Algenmaterial (Frischgewicht) eingesetzt

Die an die Ammoniumsulfat-Präzipitation anschließende Reinigung des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms aus *Ectocarpus siliculosus* setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: Nach einer Entsalzung und groben Trennung von kleineren und größeren Proteinen mit einer Sephadex<sup>®</sup> G-100-Säule erfolgte eine affinitätschromatographische Reinigung an Red Sepharose<sup>®</sup> (Bindung von Nucleotid-Cofaktor-nutzenden Proteinen). Da eine spezifische Desorption des Malat-Enzyms mit NADP<sup>+</sup> – auch in unterschiedlicher Kombination und Konzentration mit Salzen, Pyruvat oder Malat – von dieser Säule nicht erzielt werden konnte, wurde die Elution mit einem KCl-Gradienten (0,04 - 0,35 M KCl) durchgeführt. Nach Entsalzen der Fraktionen mit ME-Aktivität durch Dialyse schlossen sich eine HPLC-gestützte Ionenaustausch- sowie eine Größenausschlusschromatographie an. Von der Resource<sup>™</sup> Q-Säule eluierte der größte Anteil der Malat-Enzym-Aktivität bei einer KCl-Konzentration von ca. 0,2 M in einem distinkten Peak vor dem überwiegenden Teil der restlichen Proteine (Abb. 3.4a). Die aus der anschließenden Gelfiltration vereinigten, aktiven Fraktionen ergaben bei erneuter Aufgabe auf dieselbe Säule einen einzelnen homogenen Peak. Ähnlich wie für die gereinigte PEPCK zeigte sich auch für das ME eine geringe Stabilität nach der Größenausschlusschromatographie. Aus dem Vergleich mit verschiedenen Standardproteinen wurde für das native Malat-Enzym ein Molekulargewicht von 440 kDa bestimmt (siehe Abb. 3.2).



**Abb. 3.4a:** Elutionsdiagramm von NADP<sup>+</sup>-ME aus teilgereinigtem Extrakt von *E. siliculosus* von einer Resource™Q-Säule in der HPLC. Die Enzymaktivität eluierte bei einer KCl-Konzentration von 0,2 M.

**Abb. 3.4b:** Größenausschlusschromatographie an einer BioSil®Sec-Säule zur Isolierung von NADP<sup>+</sup>-ME aus einem vorgereinigten Proteingemisch aus *E. siliculosus*. Die Elution der PEPCK-Aktivität erfolgte nach ca. 6,1 min. Dies entspricht einer rel. molekularen Masse von ca. 440 kDa.

Die Trennung des gereinigten Enzyms in der SDS-PAGE ergab eine einzelne Bande mit einer relativen molekularen Masse von 56 kDa (Abb. 3.5).

Das NADP-ME wurde 620-fach aufgereinigt, wobei sich der affinitätschromatographische Schritt als der effektivste erwies (siehe Tab. 3.2). Aus den Daten für die Proteinreinigung ergab sich für das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym ein Anteil von ca. 0,16% am Gesamtgehalt löslichen zellulären Proteins.

**Abb. 3.5:** SDS-PAGE der verschiedenen Reinigungsschritte bei der Reinigung des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms aus *E. siliculosus*. Nach elektrophoretischer Trennung in einem 12%igen SDS-Gel wurden die Proteine einer Silberfärbung unterzogen.

Spur M: Vergleichsproteine

Spur 1 : Präzipitat nach Ammoniumsulfat-Fällung (0-55% Sättigung)

Spur 2 : aktive Fraktion nach Chromatographie an Red Sepharose

Spur 3 : aktive Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie an Resource™ Q

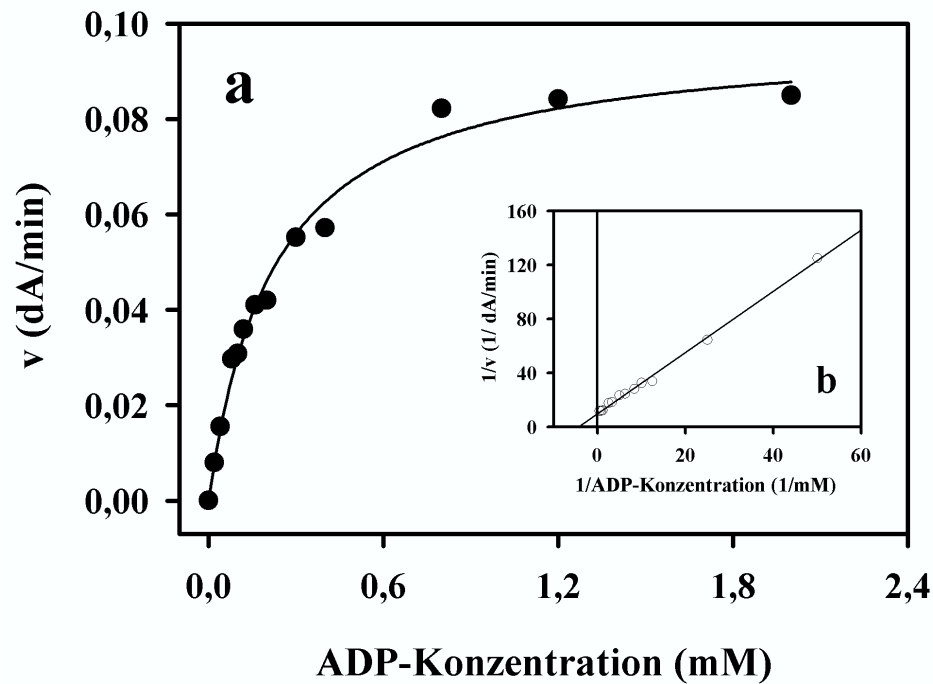
Spur 4 : gereinigtes NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym nach Gelfiltration an einer BioSil® Sec- Säule mittels HPLC

## 3.2 Enzymkinetische Charakterisierung

### 3.2.1 Substratabhängigkeiten

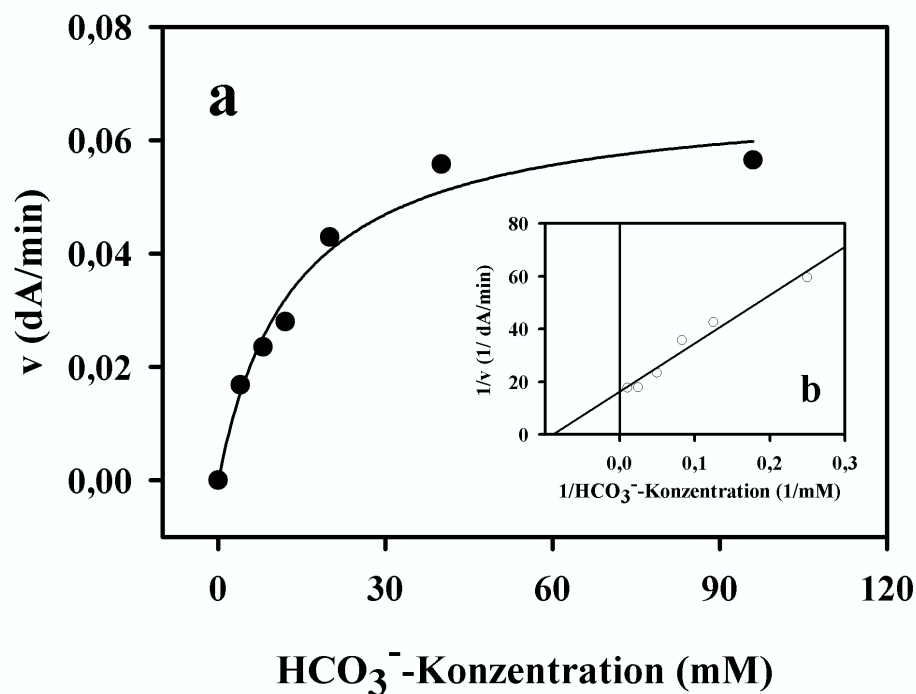
Entscheidende kinetische Parameter der PEPCK und des  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzyms aus *Ectocarpus siliculosus* wurden bereits in einer früheren Arbeit bestimmt (BUSCH, 1998). Die Ermittlung dieser früheren Werte erfolgte mit durch Aussalzchromatographie teilgereinigtem Zell-Extrakt. Zur Untersuchung, inwieweit die so bestimmten Werte auch für gereinigtes Enzym zutreffen, wurde eine  $K_m$ -Wert-Bestimmung für die einzelnen Substrate mit ca. 30- bzw. 200-fach angereinigter PEPCK bzw.  $\text{NADP}^+$ -ME (nach Chromatographie an der Resource™ Q-Säule) durchgeführt. Von der Verwendung von völlig reinem Enzym (nach Größenausschlusschromatographie mit der Bio-Sil®-Säule) musste aufgrund zu geringer Ausbeuten und mangelnder Stabilität der Enzyme nach dem letzten Reinigungsschritt abgesehen werden.

Für alle drei für die Carboxylierungsreaktion der PEPCK benötigten Substrate ( $\text{CO}_2$ , PEP, ADP) ergaben sich normale Michaelis-Menten-Kinetiken (siehe Abb. 3.6 bis 3.8) mit den in Tab. 3.3 aufgeführten  $K_m$ -Werten. Während sich im Vergleich zu den früher bestimmten Werten für ADP und PEP nur minimale Abweichungen zeigten, lag der mit annähernd reiner PEPCK für  $\text{HCO}_3^-$  ermittelte  $K_m$ -Wert ca. dreifach über dem Wert, der für die PEPCK nach Aussalzchromatographie bestimmt worden war. Auf die Bestimmung der Substratabhängigkeiten der PEPCK für die decarboxylierende Reaktion wurde verzichtet, weil diese nur ein zehntel der Aktivität der Carboxylierungsreaktion zeigte.

**Abb. 3.6:**

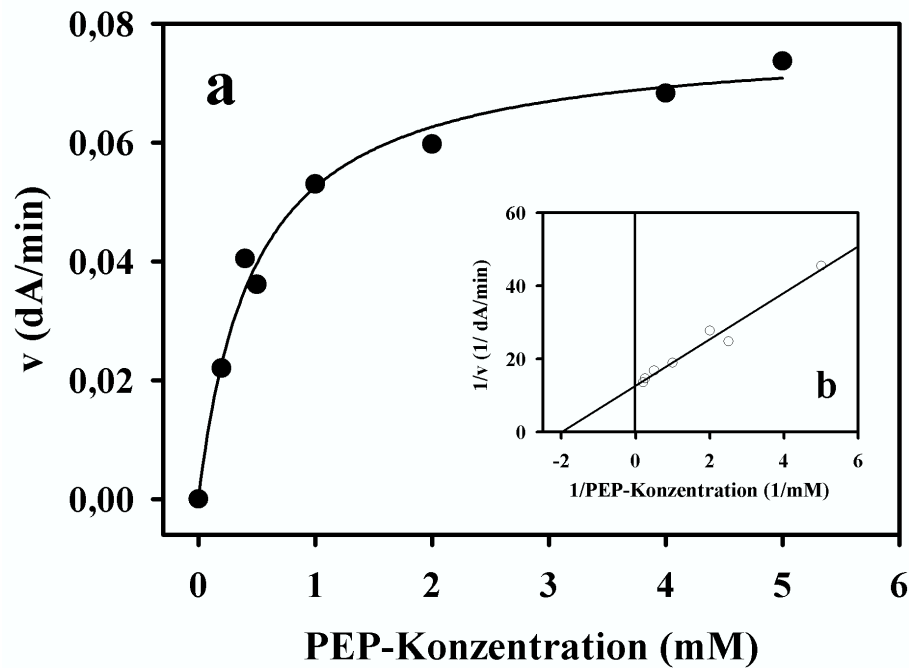
a) Abhängigkeit der Carboxylierungsaktivität der PEPCK aus *E. siliculosus* von der ADP-Konzentration. Es wurde nach Ionenaustauschchromatographie (Resource™ Q) gereinigtes Enzym verwendet. Die Messung wurde bei pH 7 und 25 °C durchgeführt.

b) Lineweaver-Burk-Auflage der unter a) dargestellten Michaelis-Menten- Kinetik.

**Abb. 3.7:**

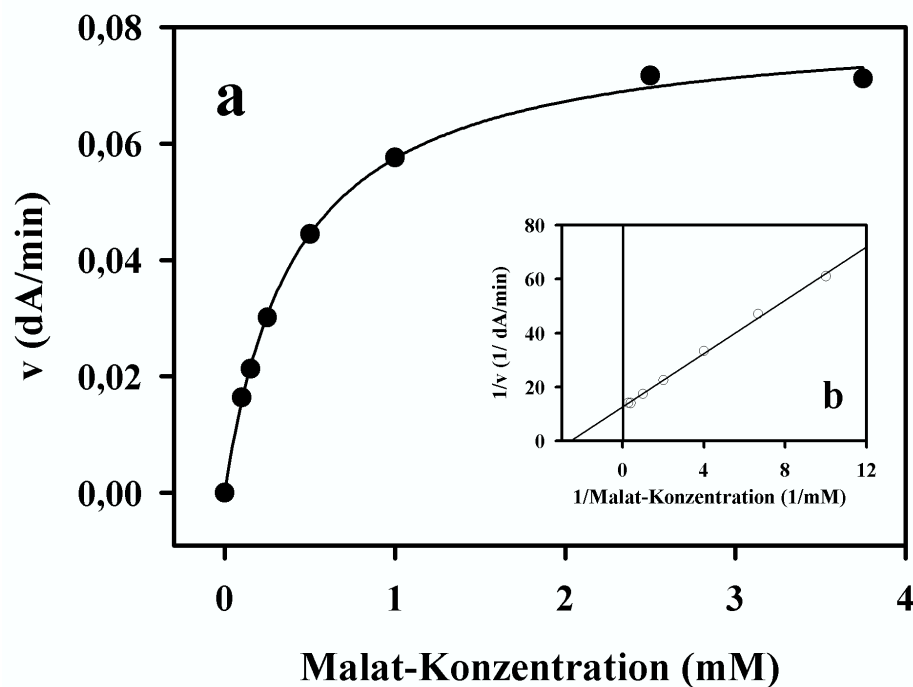
a) Abhängigkeit der Carboxylierungsaktivität der PEPCK aus *E. siliculosus* von der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration (pH 7, 25°C). Es wurde nach Ionenaustauschchromatographie (Resource™ Q) gereinigtes Enzym aus *E. siliculosus* verwendet.

b) Lineweaver-Burk-Auflage der Werte aus a).

**Abb. 3.8:**

a) Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Carboxylierungsreaktion der PEPCK aus *E. siliculosus* von der Phosphoenolpyruvat-Konzentration. Für die Messung bei pH 7 und 25°C wurde nach Ionenaustauschchromatographie (Reource™ Q) gereinigtes Enzym verwendet.

b) Doppelt reziproke Auftragung der Werte aus a).

**Abb. 3.9:**

a) Abhängigkeit der Decarboxylierungsaktivität des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms von der L-Malat-Konzentration bei pH 7.5 und 25°C (es wurde nach Ionenaustauschchromatographie gereinigtes Enzym aus *E. siliculosus* verwendet).

b) Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk der unter a) dargestellten L-Malat-Abhängigkeit des Malat-Enzyms.

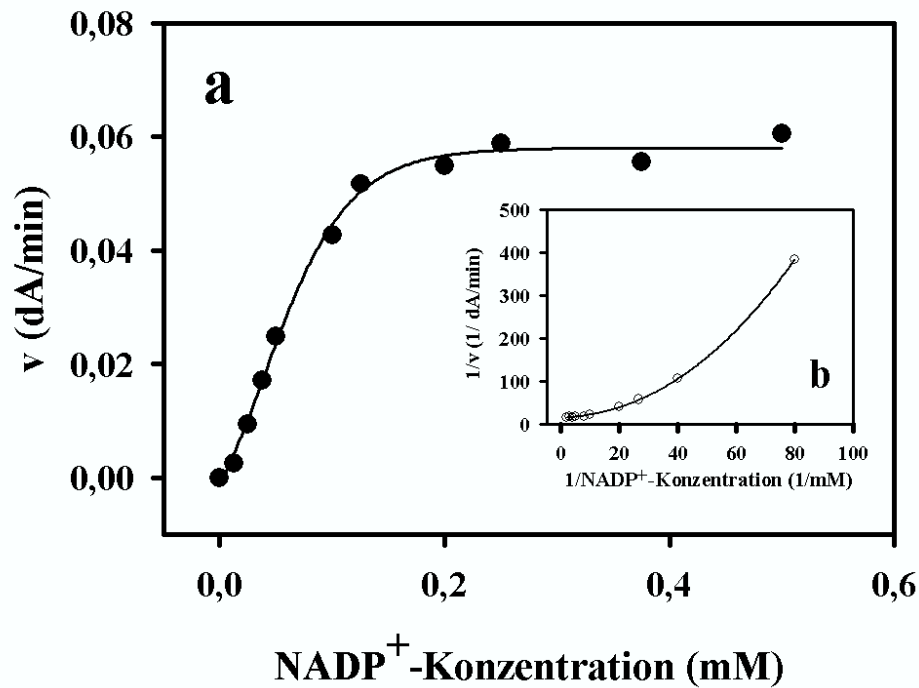


Abb. 3.10a + b:

a) Abhängigkeit der Decarboxylierungsaktivität des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* von der NADP<sup>+</sup>-Konzentration. Die Substratabhängigkeit wurde mit weitgehend gereinigtem Enzym (nach Ionenaustauschchromatographie) bei pH 7.5 und 25°C durchgeführt.

b) Doppelt reziproke Auftragung der nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik folgenden Werte aus a).

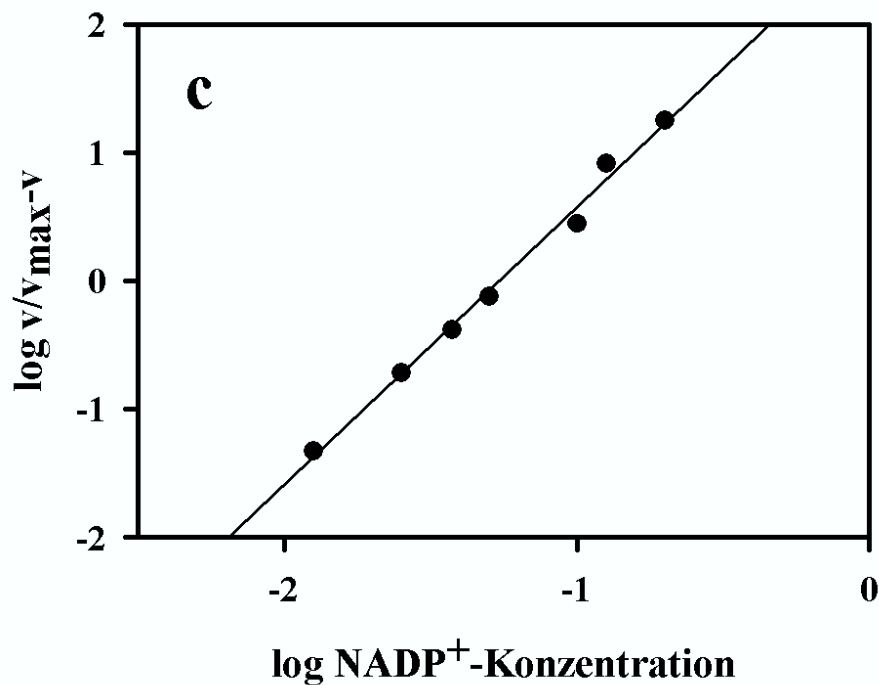


Abb. 3.10c:

Hill-Auftragung der Werte aus a)

Auch mit nahezu reinem NADP-ME konnte für Malat eine normale Michaelis-Menten-Kinetik mit typischem hyperbolischem Kurvenverlauf nachgewiesen werden. Der zugehörige  $K_m$ -Wert deutet hier im Vergleich zu nur grob angereinigtem Enzym auf eine etwas erhöhte Affinität zu Malat hin (siehe Tab. 3.3). Die Reinigung beeinflusste insbesondere das Verhalten des Enzyms gegenüber  $\text{NADP}^+$ . Während das teilgereinigte Enzym nach Aussalzchromatographie noch eine typische Michaelis-Menten Kinetik, mit einem  $K_m$ -Wert von 0,12 mM aufweist, erhält man im Falle des stark gereinigten Enzymes bei Auftragung nach Michaelis-Menten einen sigmoiden Kurvenverlauf, der auf das Vorliegen von Kooperativität hindeutet (siehe Abb. 3.10a). Der aufwärts gebogene Kurvenverlauf bei doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk bestätigt das Vorliegen von positiver Kooperativität. Zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten wurde die Steigung der aus der Auftragung von  $\log(v/v_{\max} - v)$  gegen den Logarithmus der Substratkonzentration resultierenden Ausgleichsgeraden bestimmt (siehe Abb. 3.10c). Für  $\text{NADP}^+$  wurde demnach ein Hill-Koeffizient von 2,74 ermittelt, was bedeutet, dass das Malat-Enzym über mindestens drei Bindungsstellen für  $\text{NADP}^+$  verfügt. Die Halbsaturierung des Enzyms lag bei einer  $\text{NADP}^+$ -Konzentration von 0,07 mM.

Substratabhängigkeiten in der carboxylierenden Richtung konnten nicht bestimmt werden, da die Reaktion unter den gegebenen *in vitro*-Bedingungen praktisch nicht umkehrbar war.

**Tabelle 3.3:** Vergleich der Abhängigkeit der Enzyme PEPCK und  $\text{NADP}^+$ -ME von ihren jeweiligen Substraten. Die  $K_m$ -Bestimmung erfolgte mit teilgereinigtem Zellextrakt nach Aussalzchromatographie ( $K_m$  1) bzw. mit gereinigtem Enzym (nach Resource<sup>TM</sup> Q-Ionenaustauschchromatographie;  $K_m$  2).

Enzym	Substrat	$K_m$ 1 (mM)	$K_m$ 2 (mM)
PEPCK	ADP	0,27	0,23
	$\text{HCO}_3$	36,26	11,31
	PEP	0,46	0,50
$\text{NADP}^+$ -Malat-Enzym	Malat	0,58	0,36
	$\text{NADP}^+$	0,12	Kooperativität *

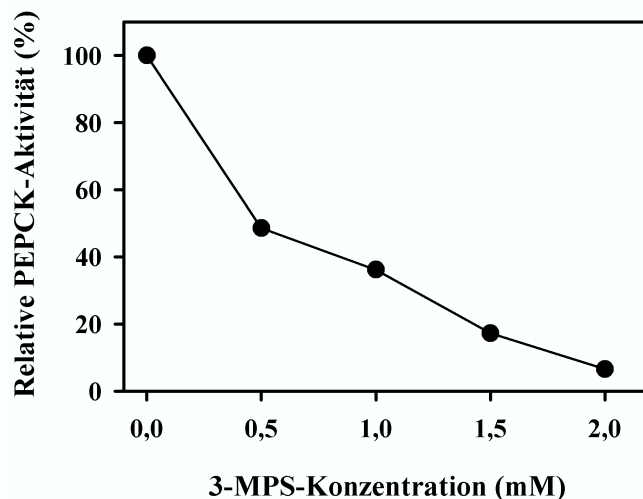
\* Hill-Koeffizient: 2,74

### 3.2.2 Hemmung der PEPCK durch 3-Mercaptopikolinsäure

Neben der Charakterisierung der PEPCK aus *E. siliculosus* anhand der dargestellten Substratabhängigkeiten wurde außerdem die Wirkung von 3-Mercaptopikolinsäure (3-MPS) auf die *in vitro*-Aktivität dieses Enzymes untersucht. 3-MPS gilt als spezifischer Inhibitor der

PEPCK aus Algen, vaskulären Pflanzen und tierischem Gewebe (KERBY und EVANS, 1983b; HARLOCKER et al., 1991; REISKIND und BOWES, 1991).

Auch für PEPCK aus *E. siliculosus* konnte eine spezifische Inhibierung der Carboxylierungs-Aktivität durch 3-MPS nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11). Das Enzym zeigte bei einer 3-MPS-Konzentration von 2 mM eine Inhibierung der *in vitro*-Aktivität von 93%.



**Abb. 3.11:** Spezifische Inhibierung der *in vitro*-Aktivität der PEPCK aus *Ectocarpus siliculosus* durch 3-MPS. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit durch Ammoniumsulfatfällung (55-80% Sättigung) teilgereinigtem Rohextrakt. 3-MPS wurde in unterschiedlichen Konzentrationen dem Enzym-Assay zugesetzt. Die photometrische Messung wurde bei pH 7 und 25°C durchgeführt.

### 3.3 Immunchemische Nachweise

#### 3.3.1 Western-Blotting und Immun-Färbung mit Antiseren aus höheren Pflanzen

Um die zeit- und kostenaufwendige Herstellung geeigneter Antikörper für immunologische Untersuchungen zu umgehen, wurden zunächst Antikörper gegen PEPCK und NADP<sup>+</sup>-ME höherer Pflanzen auf ihre Anwendbarkeit, d.h. ihre Kreuzreaktivität gegenüber Proteinen aus *Ectocarpus siliculosus*, getestet.

Es musste deshalb auf Antikörper gegen Proteine höherer Pflanzen zurückgegriffen werden, da bis zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Tests Antikörper gegen PEPCK und ME aus Braunalgen nicht existierten, bzw. ihre Existenz nicht aus Veröffentlichungen hervorging. Erst 2001 gelang es A. Cabello-Pasini (CABELLO-PASINI et al., 2001), einen Antikörper gegen PEPCK aus der Diatomee *Skeletonema costatum* herzustellen, der auch mit der PEPCK der Braunalge *Laminaria setchellii* kreuzreagierte. Die von Dr. Cabello-Pasini hergestellten Antikörper standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Daher wurde ein polyklonaler

Antikörper gegen PEPCK aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Urochloa panicoides* (FINNEGAN und BURNELL, 1995) verwendet.

Der polyklonale Antikörper gegen NADP<sup>+</sup>-ME war gegen das Enzym aus Mais-Blättern erzeugt worden (FATHI und SCHNARRENBGER, 1990).

Die Kreuzreaktivität beider Antikörper wurde nach Western-Blotting von Rohextraktproteinen aus *Kalanchoë daigremontiana* (als Vertreter einer CAM-Pflanze), aus Mais (als Vertreter einer C<sub>4</sub>-Pflanze), aus Spinat (als Vertreter einer C<sub>3</sub>-Pflanze) sowie aus *Ectocarpus siliculosus* auf eine PVDF-Membran überprüft. Die eingesetzten Verdünnungen wurden für die Rohextrakte der entsprechenden Pflanze jeweils empirisch ermittelt.

**Abb. 3.12:** Immunchemischer Nachweis von auf PVDF-Membran immobilisierter PEPCK-Polypeptide aus Rohextrakt von *Kalanchoë* (Spur 1), Mais (Spur 2), Spinat (Spur 3) und *E. siliculosus* (Spur 4) mit Antiserum gegen die PEPCK aus *Urochloa panicoides*. Eingesetzte Antiserumverdünnungen: Spur 1, 1:3000; Spur 2, 1:15000; Spur 3, 1:3000; Spur 4, 1:2000. Die Trennung der Rohextraktproteine (5 µg pro Bahn) erfolgte in einem 10%igen Gel durch SDS-PAGE. Die Detektion der Immunreaktionen erfolgte mittels eines an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers gegen Kaninchen-IgG.

**Abb. 3.13:** Immunchemischer Nachweis von auf PVDF-Membran immobilisierter NADP-ME-Polypeptide aus Rohextrakt von *Kalanchoë* (Spur 1), Mais (Spur 2), Spinat (Spur 3) und *E. siliculosus* (Spur 4) mit IgG gegen NADP-ME aus Mais-Blättern. Eingesetzte Antikörperverdünnungen: Spur 1, 1:2000; Spur 2, 1:15000; Spur 3, 1:2000; Spur 4, 1:2000. Die Trennung der Rohextraktproteine (5 µg pro Bahn) erfolgte in einem 10%igen Gel durch SDS-PAGE. Die Detektion der Immunreaktionen erfolgte mittels eines an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers gegen Kaninchen-IgG.



Der *Urochloa*-PEPCK-Antikörper zeigte keine Kreuzreaktion mit Rohextrakt-Protein aus *Ectocarpus* (Abb. 3.12). Gleichwohl konnte aber für *Kalanchoë* eine Reaktion mit einem 60 kDa-Protein und für Mais mit einem 69 und 63 kDa Protein nachgewiesen werden. Weiter zeigte sich für Spinat-Rohextrakt eine Kreuzreaktion mit einem 62 kDa-Protein.

Die Immunreaktion des PEPCK-Antikörpers mit Polypeptiden unterschiedlicher Größe (69-60 kDa) wiesen FINNEGAN und BURNELL (1995) auch in *Urochloa panicoides*-Rohextrakt nach. Sie interpretierten ihre Beobachtung so, dass das 69 kDa Polypeptid die in der Zelle aktive Untereinheit der PEPCK darstellt, während die anderen mit dem Antikörper kreuzreagierenden Banden unterschiedliche spezifische Degradationsprodukte darstellen.

Der Mais-ME-Antikörper reagierte mit einem 62 kDa-Polypeptid sowohl aus Mais als auch aus *Kalanchoë* (Abb. 3.13). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der von FATHI und SCHNARRENBURGER (1990) beschriebenen Beobachtung für das ME dieser beiden Organismen. Hingegen ergab sich weder für Spinat (Abb. 3.13/ Spur 3) noch für *Ectocarpus*-Rohextrakt (Abb. 3.13/ Spur 4) eine Kreuzreaktion mit diesem ME-Antikörper.

Neben den Antikörpern gegen PEPCK wurde auch ein Antiserum getestet (Abb. 3.14), das gegen die gereinigte, native Rubisco von Spinat gerichtet war (GROß et al., 1993) und deshalb sowohl mit der kleinen, als auch der großen Untereinheit Immunreaktion zeigte.

**Abb. 3.14:** Immundetektion der Proteinuntereinheiten von Rubisco in Rohextrakten aus *Kalanchoë* (Spur 1), Mais (Spur 2), Spinat (Spur 3) und *E. siliculosus* (Spur 4) mit polyklonalem Antiserum gegen Rubisco (natives Enzym) aus Spinat. Die durch SDS-PAGE getrennten Rohextraktproteine (im 10%igen Trenngel; je 5 µg pro Bahn) wurden mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.10), wo sie nacheinander mit dem Rubisco-Antiserum sowie dem an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert wurden. Eingesetzte Antiserum-verdünnungen: Spur 1, 1:2000; Spur 2, 1:5000; Spur 3, 1:20000; Spur 4, 1:1000. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte durch ein BCIP-NBT-Gemisch.

Der Antikörper reagierte jeweils mit einer 56 kDa- sowie einer 12 kDa-Proteinuntereinheit der getesteten Rohextrakte aus Mais, Spinat und *E. siliculosus*. Für den Extrakt aus *Kalanchoë* ergab sich eine Kreuzreaktion mit einer 57 sowie einer 15 kDa-Bande.

Diese Beobachtungen zeigen, dass sowohl der *Urochloa* PEPCK-Antikörper als auch der Antikörper gegen das NADP<sup>+</sup>-ME aus Mais keine nachweisbaren, spezifischen Kreuzreaktionen zumindest mit den denaturierten Enzymen PEPCK und ME aus *E. siliculosus* eingehen und daher für den Einsatz bei intrazellulären Lokalisationsversuchen ungeeignet sind. Aus diesem Grund wurden mit den aus *E. siliculosus* gereinigten und mittels SDS-PAGE getrennten Enzymen PEPCK und NADP-ME Kaninchen zur Produktion spezifischer Antikörper immunisiert.

### 3.3.2 Antikörper gegen PEPCK und ME von *E. siliculosus*

#### 3.3.2.1 IgG-Reinigung

Zur Erzeugung polyklonaler Antikörper gegen PEPCK und NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus *Ectocarpus siliculosus* wurden Kaninchen mit gereinigtem und im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrenntem Enzym (PEPCK: 62 und 18 kDa Polypeptid; ME: 56 kDa Polypeptid) immunisiert (siehe 2.13). Nach einem verlängerten Standard-immunisierungsprotokoll (122 Tage) wurden nach der Entblutung aus dem Serum durch anschließende IgG-Reinigung die polyklonalen Antikörper gewonnen (2.14). Die Effektivität der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE in einem 10%igen Gel überprüft. Für alle drei Seren ergab sich nach Coomassie-Färbung eine reine IgG-Fraktion mit einer klaren intensiven 53 kDa Bande sowie einer sehr schwachen breitgezogenen Bande im Bereich von 23 kDa. Die Molekulargewichte der getrennten Proteine liegen damit im Bereich der für die großen und kleinen Untereinheiten von IgG-Molekülen zu erwartenden Größe. Als Beispiel ist in Abb. 3.15 elektrophoretisch getrenntes Serum und die gereinigte IgG-Fraktion des mit dem 18 kDa Polypeptid der PEPCK erzeugten Antiserums dargestellt.

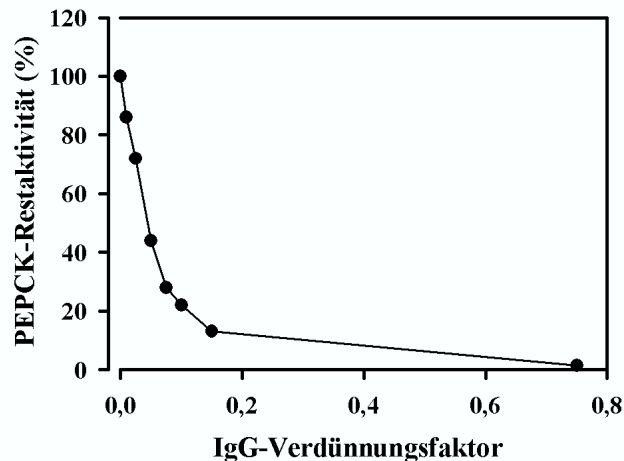
**Abb. 3.15:** Reinigung der IgG-Fraktion aus Antiserum gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK aus *Ectocarpus siliculosus*. Die elektrophoretische Trennung des Antiserums (Spur 1) sowie der mittels Protein G daraus isolierten IgG-Moleküle (Spur 2) erfolgte in einem 10%igen SDS-Gel. Die mit M bezeichnete Spur zeigt die Referenzproteine.

### 3.3.2.2 Immunpräzipitation / Immuninhibition

Zur Titer- und Spezifitätsbestimmung der erzeugten IgG-Fraktionen wurden Immunpräzipitations- und Immuninhibitionsstudien mit durch Ammoniumsulfatsättigung gefällten Rohextraktfraktionen (0-55% für NADP-ME bzw. 55-80% für PEPCK) aus *E. siliculosus* durchgeführt (siehe Abb. 3.15). Insgesamt wurden dabei für den PEPCK-Immunassay 0,10 mg Protein und für den ME-Assay 0,25 mg Protein eingesetzt.

Bei der Verwendung von IgG gegen das 62 kDa-Polypeptid der PEPCK sowie dem gegen das NADP-ME wurde weder die Aktivität der Enzyme im Assay gestört (Immunhemmung), noch konnte in einem Immunfällungstest (Fällung unter Einsatz der gereinigten IgG-Fraktion) Aktivität präzipitiert werden.

Im Gegensatz dazu wurden mit einer Verdünnung von 1:10 (AK:AG) des Antikörpers gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK 78% der PEPCK-Aktivität des AS-gefällten Rohextraktes präzipitiert (siehe Abb. 3.16). Mit einer neunfach höheren Antikörper-Konzentration stieg der Prozentsatz immunpräzipitierter PEPCK auf 98,5% an. Kontrollversuche, in denen anstelle des Antikörperserums Präimmunserum eingesetzt wurde, gaben keine Hinweise auf spezifische Kreuzreaktionen. Diese Werte zeigen, dass das native Enzym spezifisch von dem Antikörper, der gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK aus *E. siliculosus* gebildet wurde, erkannt wird. Eine Hemmung der Aktivität des Enzyms war aber auch mit diesem Antikörper nicht möglich.



**Abb. 3.16:** Immunpräzipitation der PEPCK aus *E. siliculosus* mit Immunglobulin G aus polyklonalem Antiserum gegen das 18 kDa Polypeptid der PEPCK aus *E. siliculosus*. Die Messungen wurden mit Enzym in AS-gefälltem (55-80% Sättigung) *Ectocarpus*-Rohextrakt durchgeführt (je 0,1 mg Gesamtprotein). Immunkomplexe wurden durch an Acrylperlen gebundenes Protein A adsorbiert und vor der Enzymaktivitätsbestimmung durch Zentrifugation aus dem Assay entfernt. Es wurde die Restcarboxylierungs-Aktivität der PEPCK im Verhältnis zum Kontrollansatz ohne Antikörperzugabe ermittelt

### 3.3.2.3 Western-Blotting und Immun-Färbung

Die IgG-Fractionen der gegen das 62 kDa-Polypeptid der PEPCK und der gegen das ME gerichteten Seren zeigten ebenfalls keine Reaktion mit Polypeptiden nach der SDS-PAGE und Western-Transfer auf PVDF-Membranen (Abb. 3.17, 3.18). Dies galt sowohl für Rohextrakte als auch für die gereinigten Proteine der Alge.

**Abb. 3.17:** Immunchemische Färbung von NADP-ME in Rohextrakt bzw. gereinigtem Enzym nach SDS-PAGE und Western-Transfer auf PVDF-Membran unter Einsatz der IgG-Fraktion des gegen das ME der Alge gerichteten Serums. Eingesetzte Antikörperverdünnungen: Spur 1, 1:500; Spur 2, 1:1500; Spur 3, 1:500.

Als sekundärer Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Die Farbreaktion erfolgte mit einem BCIP/NBT-Gemisch.

Spur 1: Rohextrakt

Spur 2: gereinigtes ME

Spur 3: Rohextrakt; Immundetektion mit Präimmunserum des Kaninchens

**Abb. 3.18:** Immunchemische Färbung von PEPCK in Rohextrakt bzw. gereinigtem Enzym nach SDS-PAGE und Western-Transfer auf PVDF-Membran unter Einsatz der IgG-Fraktion des gegen das 62 kDa-Polypeptid der PEPCK der Alge gerichteten Serums. Eingesetzte Antikörperversdünnungen: Spur 1, 1:1000; Spur 2, 1:500.

Als sekundärer Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Die Farbreaktion erfolgte mit einem BCIP/NBT-Gemisch.

Spur 1: Rohextrakt

Spur 2: gereinigte PEPCK

Demgegenüber konnte eine spezifische Immunreaktion mit der IgG-Fraktion des gegen das 18 kDa-Protein gerichteten Serums nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Hier zeigte sich sowohl mit dem Rohextrakt als auch mit der gereinigten PEPCK eine deutliche Reaktion sowohl mit der 18 kDa-Bande als auch mit der 62-kDa-Bande. Eine weitere Markierung im  $M_r$ -Bereich von ca. 23 kDa, die nur in Verbindung mit Rohextrakt auftrat, zeigte sich auch bei Kontrollansätzen, bei denen anstelle des primären Antikörpers Präimmunserum eingesetzt wurde (Abb 3.19/ Spur 3).

**Abb. 3.19:** Immunchemischer Nachweis von auf PVDF-Membran immobilisierten Polypeptiden aus *Ectocarpus siliculosus* mit IgG gegen das 18 kDa Polypeptid der PEPCK. Eingesetzte Antikörperversdünnungen: Spur 1, 1:6000; Spur 2, 1:1000; Spur 3 (Präimmunserum) 1:2000.

Als sekundärer Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase versehener Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Die Farbreaktion erfolgte mit einem BCIP/NBT-Gemisch.

Spur 1: gereinigte PEPCK

Spur 2: Rohextrakt

Spur 3: Immundetektion mit Präimmunserum des Kaninchens

In weiterführenden Immunoblot-Untersuchungen (ohne Abbildung) wurde die IgG-Fraktion des gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK aus *E. siliculosus* gerichteten Serums auf seine Kreuzreaktivität gegenüber Proteinen in Rohextrakten von *Kalanchoë*, Mais und Spinat hin untersucht. Dabei ergaben sich in allen drei Fällen keine spezifischen Reaktionen.

### 3.4 Intrazelluläre Lokalisation

#### 3.4.1 Wahl der Fixierungsbedingungen

Für intrazelluläre Lokalisationsstudien müssen die Zellen fixiert werden, um die Zellstrukturen während der anschließenden Behandlung weitestgehend zu erhalten. Verschiedene Vorversuche zeigten, dass sich die in der Literatur beschriebenen Fixierungsmethoden auf das hier verwendete Algenmaterial nicht anwenden ließen. Beispielsweise erwies sich ein von KATSAROS et al. (1991) für *E. siliculosus* eingesetztes Protokoll (2 min Inkubation in 0,5 ml 0,5% Igepal® in MT-Puffer (15 mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM EGTA, 15 mM KCl, pH 7), dann Zugabe von 0,5 ml 5% Paraformaldehyd in MT-Puffer und weitere 15 min Inkubation) als ungeeignet, weil der gesamte Zellinhalt der damit behandelten Zellen sich zu einer strukturlosen Masse auflöste (Abb. 3.20).

**Abb. 3.20:** *Ectocarpus siliculosus*-Zellen nach 17-minütiger Inkubation nach dem von KATSAROS et al. (1991) vorgeschlagenen Protokoll zur Fixierung von Zellen dieser Algenart. Das Bild zeigt die Auflösung sämtlicher, innerhalb der Plasmamembran befindlicher Bereiche und damit die Ungeeignetheit der angewendeten Fixierungsmethode. Die Aufnahme erfolgte an einem Inversen Mikroskop (IM 35, Zeiss) mit einem 60er-Objektiv.

Mit Hilfe zahlreicher Versuche unter Einsatz verschiedener Puffer (Hepes, Tris, Pipes, Na-Phosphat), Fixantien (Glutaraldehyd, Methanol, Ethanol, Paraformaldehyd), Detergentien und Salzen in unterschiedlichen Konzentrationen erwies sich das unter 2.16.1 beschriebene Fixierungsprotokoll für *E. siliculosus* (Es BHI 293) als das geeignetste.

Für die anschließende Antikörperinkubation mußte ebenfalls ein geeignetes System entwickelt werden, da selbst nach 30-minütiger Vorfixierung die Inkubation mit Antikörpern in den üblichen Medien bei Raumtemperatur (vermutlich durch Quellungsprozesse) zur Zerstörung von Zellstrukturen führte (Abb. 3.21).

**Abb. 3.21:** Zellen von *E. siliculosus* nach Vorfixierung und anschließender 30-minütiger Inkubation mit in 1% BSA in TBS verdünnter Antikörperlösung bei Raumtemperatur. Neben der zu vermutenden Quellung der Zellwand ist auch die Zerstörung intrazellulärer Zellstrukturen erkennbar (Aufnahmebedingungen wie unter 3.20).

Die unter 2.16.3 ff aufgeführte Inkubationsmethode stellt schließlich das für diese Zellen optimierte System dar. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte hier weder auf Eis noch bei Raumtemperatur zu anderen als den gezeigten Ergebnissen.

Als Beweis für die Eignung der entwickelten Methode zur immuncytologischen Lokalisation von Proteinen in *E. siliculosus* diente der intrazelluläre Nachweis von Tubulin mit einem monoklonalen Anti-Tyrosin-Tubulin-Antikörper aus Maus (Sigma). Abb. 3.22a zeigt, dass auf diese Weise eine Lokalisation des verzweigten Tubulin-Filament-Skeletts innerhalb der gesamten - mechanisch aufgebrochenen - Zelle möglich ist. Zur Verdeutlichung der Zellausmaße wurde parallel zur Fluoreszenz des an den Tubulin-AK gekoppelten Fluorescein-Isothiocyanats die innerhalb der Chloroplastenbänder auftretende Chlorophyll-Autofluoreszenz derselben Zelle aufgenommen (Abb. 3.22b). In Kontrollen, in denen ausschließlich der sekundäre Anti-Maus IgG-Antikörper aus Ziege eingesetzt wurde, konnte keine oder nur sehr geringe, unspezifisch über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 3.23).

**Abb. 3.22a+b:** Immuncytochemischer Nachweis von Tubulin in *Ectocarpus siliculosus*-Zellen. Fixierte Zellen (siehe 2.16.1) wurden mit primärem monoklonalem Anti-Tyrosin-Tubulin-Antikörper aus Maus (Sigma) und anschließend mit Cy<sup>TM</sup>2 -konjugierten Anti-Maus G-Immunglobulinen inkubiert. Die konfokale Aufnahme wurde mit dem Laser-Scan Mikroskop TCS SP2 (Leica) gemacht. Bild **a** zeigt die durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbargemachten Tubulinfilamente (grün) der Alge. Anhand der Autofluoreszenz der Chloroplastenbänder (rot) der selben Zelle (Bild **b**) werden die Ausmaße der Zelle und der Verlauf der Tubulin-Filamente entlang den Plastiden verdeutlicht.

**Abb. 3.23:** *E. siliculosus*-Zelle, die zur Kontrolle nur mit sekundärem Cy<sup>TM</sup>2-Anti- Maus- IgG- Antikörper inkubiert wurde. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 3.22. Die indirekte Immunfluoreszenz (grün) und die Autofluoreszenz der Chloroplastenbänder (rot) sind überlagert dargestellt.

### 3.4.2 Lokalisation von Rubisco und PEPCK in *Ectocarpus siliculosus*-Zellen

Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden mit IgG gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK aus *E. siliculosus* und zum Vergleich auch mit dem Anti-Spinat-Rubisco-Antiserum durchgeführt. Der Anti-PEPCK-Antikörper ergab eine deutliche Fluoreszenz der mit den Chloroplasten assoziierten Pyrenoide (Abb. 3.24a; siehe dazu auch eine Interferenzkontrastaufnahme der selben Zelle (Abb. 3.24b)). Diese spezifisch auftretende Immunfluoreszenz zeigte sich nicht, wenn die Zellen mit Präimmunserum (Abb. 3.25), oder nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden (Abb. 3.26).



**Abb. 3.24a+b:** Lokalisation von PEPCK in einer Zelle der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* mittels indirekter Immunfluoreszenz (Bild **a**). Die Inkubation erfolgte mit primärem Antikörper gegen das 18 kDa Polypeptid der PEPCK aus *E. siliculosus* (Verdünnung 1:20) und mit einem sekundären FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Antikörperfluoreszenz (grün) und Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) sind überlagert dargestellt. Pfeile zeigen auf die stark fluoreszenzmarkierten (grün) Pyrenoide. Abb. 3.24b zeigt die im Differentialinterferenzkontrast aufgenommene Zelle aus Abb. 3.24a. Pfeile zeigen auf dieselben, bei dieser Aufnahme hyalin erscheinenden Pyrenoide wie in Abb. 3.24a. Während Bild **a** eine in z-Richtung konfokal durchgescannte Zelle zeigt, beschränkt sich Bild **b** auf einen nicht konfokalen optischen Schnitt.

**Abb. 3.25:** Kontrollversuch mit einer mit Präimmunserum (vor Immunisierung mit dem 18 kDa-PEPCK-Polypeptid) als ersten Antikörper behandelten *Ectocarpus*-Zelle. Als sekundärer Antikörper diente ein FITC-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Dargestellt ist ein Überlagerungsbild aus Immunfluoreszenz (grün) und der Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot).

**Abb. 3.26:** *Ectocarpus siliculosus*-Zelle, die zur Kontrolle nur mit sekundärem FITC-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert wurde. Dargestellt ist ein Überlagerungsbild aus Immunfluoreszenz (grün) und Autofluoreszenz der Chloroplastenbänder (rot).

Auch der Einsatz des polyklonalen Antikörperserums gegen Spinat-Rubisco ergab ein deutliches Fluoreszenz-Signal, das ebenfalls mit den Pyrenoiden assoziiert war (Abb. 3.27). Wie im Falle des Antikörpers gegen das 18 kDa Polypeptid der PEPCK sowie des Präimmunserums treten auch hier zum Teil schwache Fluoreszenzen über den gesamten Zellbereich verteilt auf, die aufgrund ihrer geringen Intensität und diffusen Verteilung als nicht-spezifisches Binden des Primär- oder aber des Sekundär-Antikörpers zu werten sind. Auch gelegentlich auftretende stärkere Fluoreszenzsignale insbesondere an den Bruchstellen der Zellen sowie im Bereich der im Verlauf der gesamten Präparation aufgequollenen Zellwände sind aufgrund ihres sehr unregelmäßigen Auftretens als unspezifisch einzustufen.

**Abb. 3.27:** Immuncytochemischer Nachweis von Rubisco in *E. siliculosus*-Zellen. Nach Inkubation mit dem primären Anti-Rubisco-Antikörper (1:50 verdünnt) erfolgte die Bindung des sekundären FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers. Im Überlagerungsbild deutlich zu erkennen sind die grün fluoreszierenden, mit den Chloroplasten (rot) assoziierten Pyrenoide.

### 3.4.3 Immunlokalisation von PEPCK und Rubisco nach Anzucht im Schwachlicht

Wurden Algen aus normalen Lichtverhältnissen drei Wochen unter Schwachlichtbedingungen ( $0,15 \text{ Wm}^{-2}$ ) kultiviert (unter Beibehaltung des Tag-/Nachtrhythmus) und im Anschluß daran mit dem P18-PEPCK-Antikörper behandelt, so zeigten diese keine Fluoreszenz mehr in den Pyrenoiden (ohne Abbildung). Rubisco blieb jedoch immuncytochemisch in den Pyrenoiden nachweisbar, allerdings in abgeschwächtem Maße (Abb. 3.28). Weitere zwei Wochen unter Schwachlicht hatten eine weitere Reduzierung bis hin zum völligen Verschwinden der indirekten Immunfluoreszenz in den Pyrenoiden zur Folge (Abb. 3.29).

**Abb. 3.28:**

Linkes Bild: Immuncytochemischer Nachweis von Rubisco in *E. siliculosus*-Zellen, die drei Wochen unter Schwachlicht-Bedingungen ( $0,15 \text{ Wm}^{-2}$ ) kultiviert wurden. Nach Inkubation mit einem primären Spinat-Rubisco-Antikörper (Verdünnung 1:50) erfolgte die Bindung eines sekundären FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers nach dem unter 2.16 aufgeführten Protokoll. Im Vergleich zu unter Normalbedingungen (Abb. 3.27) angezogenen Zellen tritt hier eine verminderte Fluoreszenz in den Pyrenoiden auf.

**Abb. 3.29:**

Rechtes Bild: Wie unter Abb. 3.28 behandelte, allerdings fünf Wochen unter SL-Bedingungen kultivierte *E. siliculosus*-Zellen. Hier zeigt sich ein weiterer, deutlicher Verlust der Fluoreszenz in den Pyrenoiden.

Beide Aufnahmen zeigen die Überlagerung der indirekten Immunfluoreszenz sowie der Autofluoreszenz der Chloroplastenbänder.

### 3.5 Immunlokalisationsversuche von Tubulin, PEPCK und Rubisco in der Braunalge *Pylaiella littoralis*

*Pylaiella littoralis* wurde zum Vergleich herangezogen, weil ihre Plastiden nicht band- sondern ei- bis linsenförmig sind.

Wie für *Ectocarpus siliculosus* wurde auch für Zellen von *Pylaiella littoralis* zunächst die Anwendbarkeit der unter 2.16 aufgeführten Methode zur immuncytochemischen Lokalisation von Proteinen durch Einsatz eines Anti-Tyrosin-Tubulin-Antikörpers überprüft. Wie in Abbildung 3.30a zu sehen ist, ist auch hier, ähnlich wie bei *Ectocarpus*, eine spezifische Fluoreszenzmarkierung der über den gesamten Zellbereich verzweigten Mikrotubuli möglich. In Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert worden waren, konnte keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 3.31).

**Abb. 3.30a+b:** Immuncytochemischer Nachweis von Tubulin in *Pylaiella littoralis*-Zellen. Fixierte Zellen (siehe 2.16.1) wurden mit primärem monoklonalem Anti-Tyrosin-Tubulin-Antikörper aus Maus (Sigma) und anschließend mit Cy<sup>TM</sup>2-konjugierten Anti-Maus G-Immunglobulinen inkubiert. Das linke Bild zeigt die durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemachten Mikrotubuli der Alge. Anhand der Autofluoreszenz der kugelförmigen Chloroplasten derselben Zelle (rechtes Bild) sollen die Ausmaße der Zelle verdeutlicht werden.

**Abb. 3.31:** *Pylaiella littoralis*-Zelle, die zur Kontrolle nur mit sekundärem Cy<sup>TM</sup>2-Anti-Maus-IgG-Antikörper inkubiert wurde. Dargestellt ist ein Überlagerungsbild aus indirekter Immunfluoreszenz (grün) und Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot).

Sämtliche in Lokalisationsversuchen mit *Ectocarpus*-Zellen eingesetzten Antikörper wurden auch mit *Pylaiella*-Zellen getestet. Dabei konnte lediglich mit dem Antikörper gegen Rubisco aus Spinat eine spezifische Markierung nachgewiesen werden. Wie bei *Ectocarpus* beschränkte sich die FITC-Fluoreszenz auch hier auf die Pyrenoide (Abb. 3.33). Obwohl in *Ectocarpus* der Einsatz des Antikörpers gegen das 18 kDa PEPCK-Polypeptid zu einer klaren Markierung in den Pyrenoiden führte, zeigte sich in *Pylaiella*-Zellen kein dem Antikörper zuzuschreibendes Signal (Abb. 3.32). Diese Beobachtung könnte ihre Erklärung darin finden, dass die *Pylaiella*-Zellen nur über sehr geringe Mengen an PEPCK verfügen. Auch Enzym-Aktivitätsbestimmungen mit Rohextrakten aus *Pylaiella*-Zellen (unter den gleichen Bedingungen wie für *Ectocarpus* gewonnen) zeigten vergleichsweise sehr geringe PEPCK- und NADP-ME-Aktivitäten.

**Abb. 3.32:** Versuch zur Lokalisation von PEPCK in *P. littoralis*-Zellen. Die Primärinkubation erfolgte mit dem durch Immunisierung mit PEPCK (18 kDa Polypeptid) aus *E. siliculosus* gewonnenen Antiserum (IgG-Fraktion). Nach Inkubation mit dem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper zeigte sich keine deutliche, durch Kreuzreaktion mit einem spezifischen Antikörper hervorgerufene, Immunfluoreszenz. Dargestellt ist ein Überlagerungsbild der indirekten Immunfluoreszenz (grün) und der Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot).

**Abb. 3.33:** Immuncytochemischer Nachweis von Rubisco in *Pylaiella littoralis*-Zellen. Nach Inkubation mit einem primären Spinat-Rubisco-Antikörper erfolgte die Bindung eines sekundären FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers nach dem unter 2.16.3/4 aufgeführten Protokoll. Im Überlagerungsbild deutlich zu erkennen sind die grün fluoreszierenden mit den Chloroplasten (rot) assoziierten Pyrenoide (Pfeile).

### 3.6 Lokalisation acider Kompartimente in *E. siliculosus*-Zellen

Zur Lokalisation acider Bereiche in Zellen von *E. siliculosus* wurde der Fluoreszenz-pH-Indikator Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure gewählt. Dieser konnte bereits in höheren Pflanzen erfolgreich zum Nachweis acider Zellkompartimente eingesetzt werden (WILSON et al., 1998).

Nach 20-minütiger Inkubation der Algenzellen mit CDFFDA (20  $\mu$ M) in Anwesenheit des Carboanhydrase-Inhibitors Ethoxylolamid (40 $\mu$ M; ohne Inhibitorzugabe wurde der größte Teil des veresterten Farbstoffs extrazellulär hydrolysiert und konnte deshalb nicht in ausreichender Konzentration in der Zelle akkumulieren) zeigte sich intensive Fluoreszenz in den Pyrenoiden der Alge (Abb. 3.34). Innerhalb der einzelnen Pyrenoide traten scheinbar unregelmäßig verteilt einige kleinere Bereiche auf, die stärker fluoreszierten als der Rest des Pyrenoiden.

**Abb. 3.34:** Färbung acider Kompartimente in Zellen von *E. siliculosus* mit dem Fluoreszenz-pH-Indikator CDFFDA in Anwesenheit von Ethoxzolamid. Der Indikator markiert ausschließlich Bereiche innerhalb der Pyrenoide der Alge (grün). Die rote Färbung stammt von der Autofluoreszenz der Plastiden.

### 3.7 Proteinsequenzierung

Zur Ermittlung von Aminosäuresequenz-Informationen wurden die gereinigten Enzyme mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Alle drei Polypeptide (18 kDa- und 62 kDa-Polypeptid der PEPCK, ME) wurden von ihrem N-Terminus ausgehend ansequenziert. Dabei wurden jeweils 15 Sequenzierungszyklen durchlaufen.

Während sich für die beiden PEPCK-Polypeptide klare Chromatogramme mit den in Tab 3.4 aufgeführten Aminosäure-Sequenzen ergaben, konnte für das ME keine eindeutige Sequenz ermittelt werden, weil das Protein offenbar N-terminal "blockiert" vorlag. Von der teureren Sequenzierung interner Aminosäurebereiche des Malat-Enzyms mußte aus Kostengründen abgesehen werden.

**Tabelle 3.4:** Durch N-terminale Sequenzierung ermittelte Aminosäuresequenz der Polypeptide der PEPCK aus *E. siliculosus*

PEPCK-Polypeptid	Aminosäure-Sequenz (N-C)
P 62	ATVSS LGIDK ATGIT
P 18	SGQAD YAANY TADQK

Die Benennung der Aminosäuren erfolgte nach dem Ein-Buchstaben-Code

### 3.8 RNA-Isolierung aus *Ectocarpus siliculosus*

Ausgehend von mRNA aus *E. siliculosus* sollten die für PEPCK und NADP<sup>+</sup>-ME codierenden DNA-Sequenzen ermittelt werden.

In anfänglichen Versuchen zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *E. siliculosus* erwies sich die auf Guanidinisothiocyanat basierende *Single-Step*-Methode von CHOMCZYNSKI UND SACCHI (1987) als ungeeignet, obwohl sie bei verschiedenen höheren Pflanzen bereits erfolgreich zur RNA-

Isolierung eingesetzt wurde. Auch der Einsatz von Trizol<sup>®</sup> Reagenz (CHOMZYNSKI, 1993) erbrachte keine saubere RNA-Präparation. Erst die Anwendung eines ursprünglich für *Fucus vesiculosus* entwickelten abgewandelten RNA-Isolierungsprotokolls (PEARSON et al., 2001) welches auf der klassischen, aber zeitaufwändigen Phenol/Chloroform-Extraktion beruht, erwies sich mit Abwandlungen als für *E. siliculosus* geeignet (siehe 2.19.1). Nach elektrophoretischer Trennung im denaturierenden Agarosegel ergab sich hier für die isolierte RNA je eine Bande im Bereich von 3200 sowie von 1800 Basen (siehe Abb. 3.35). Es ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um die 25S sowie die 18S rRNA der Alge handelt.

**Abb. 3.35:** Trennung von aus *E. siliculosus* isolierter Gesamt-RNA im 1%igen danaturierenden RNA-Agarosegel (2.22.2). Sowohl von der Gesamt-RNA (Spur 1) als auch von der Vergleichs-RNA (Spur M) wurde je 1 µg aufgetragen.

### 3.9 3'-RACE-PCR

Ausgehend von Gesamt-RNA bzw. daraus gereinigter Poly-A<sup>+</sup>-RNA erfolgte die Synthese der Erststrang-cDNA durch reverse Transkription (2.24.1). Die synthetisierte cDNA wurde direkt als Template in 3'-RACE PCR-Reaktionen eingesetzt (2.24.2). Neben dem SMART-Primer (antisense; Sequenz, siehe cDNA Synthese-Primer bei CHENCHIK et al, 1998) wurden verschiedene genspezifische degenerierte sense-Primer eingesetzt (siehe Tab. 3.5). Die Primer GSP P62 und GSP P18 wurden von den Abschnitten der N-terminalen Aminosäuresequenzen der 62 kDa- und 18 kDa-Polypeptide der PEPCK abgeleitet. Aufgrund der fehlenden Aminosäuresequenzdaten des Malat-Enzyms von *E. siliculosus* wurde der GSP ME von einer Konsensus-Sequenz abgeleitet. Für das Alignment (mit dem Programm *ClustalW*; THOMPSON et al., 1994) wurden Sequenzen von *Arabidopsis*, *Phaseolus*, *Flaveria*, *Ricinus*, *Populus*, *Oryza*, *Zea*, *Cucurbita*, *Homo sapiens*, *Salmonella*, *Yersinia* und *Mesorhizobium* gewählt. Dabei erwies sich der Sequenzbereich zwischen Aminosäure 325 bis 333 (Q F E D F A N H N) des NADP-ME aus *Zea mays* (NCBI Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Accession*:

AAP33011) als stark konservierter Bereich und wurde daher für die Ableitung des Primers verwendet.

**Tabelle 3.5:** In 3'-RACE PCR Experimenten verwendete Primer zur Amplifikation von PEPCK- und ME-codierenden Sequenzen aus *E. siliculosus*

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Herkunft	Richtung
GSP P18 (1)	GCI GA (CT) TA (CT) GCI GCI AA (CT) TA (CT) ACI GCI GA	AS 4-13 des 18 kDA Polypeptids der PEPCK aus <i>E. siliculosus</i>	sense
GSP P18 (2)	GGI CA (AG) GCI GA (CT) TA (CT) GCI GC	AS 2-8 des 18 kDA Polypeptids der PEPCK aus <i>E. siliculosus</i>	sense
GSP P62	GGI ATC GA (CT) AA (AG) GCI ACI GGI ATC AC	AS 7-15 des 62 kDA Polypeptids der PEPCK aus <i>E. siliculosus</i>	sense
GSP ME	CAG TT (CT) GAG GA (CT) TT (CT) GCI AA (CT) CA (CT) AA	AS 325-333 der NADP-ME- Sequenz von <i>Zea mays</i>	sense
SMART- Primer	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	Abgeleitet von der Sequenz des 3'-cDNA-Synthese Primers (Kit)	antisense
UPM (Universal Primer Mix)	<u>Long Up:</u> CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT <u>Short Up:</u> CTA ATA CGACTC ACT ATA GGG C	SMART™RACE cDNA Amplifikations Kit	antisense

I steht für Inosin

Die Amplifikationsreaktionen wurden mit cDNA (ausgehend von Gesamt-RNA oder Poly-A<sup>+</sup>-RNA) als Template durchgeführt. Das verwendete Temperaturprogramm (Tab. 3.6) war auf die verschiedenen Primer abgestimmt.

**Tabelle 3.6:** Temperaturprogramm für 3'-RACE-PCR-Amplifikationen

1	Denaturierung	94°C	1 min
2	Denaturierung	94°C	30 sec
3	Annealing	60°C SMART Primer/ 72°C UPM	1 min
4	Elongation	72°C	3 min
5	Denaturierung	94°C	30 sec
6	Annealing	x°C	1 min
7	Elongation	72°C	3 min
8	Elongation	72°C	10 min

5x

25-45x bzw.  
30x bei 52°C  
für GSP P62



Während die Schritte zwei bis vier, die eine spezifische Bindung des SMART-Primers (bzw. der UPM-Primer) ermöglichten, für alle Reaktionsansätze gleich waren, wurde die Annealing-Temperatur des sechsten Schrittes (siehe Tab. 3.6) - dem eingesetzten genspezifischen Primer entsprechend - in einem Bereich von 5°C oberhalb bis 10°C unterhalb der errechneten Temperatur variiert. Ebenso wurde die Zyklenzahl der Schritte fünf bis sieben zwischen 25 und 45 variiert. Als Kontrolle wurden Ansätze mit nur einem der beiden Primer verwendet. Außerdem diente ein Ansatz als weitere Kontrolle, in dem der SMART-Primer durch den UPM ersetzt wurde. Die Einführung der Long- und Short-Up-Primersequenz in das PCR-Produkt ermöglichte hierbei "Suppression PCR" (SIEBERT et al., 1995) und "Step out PCR" (MATZ et al., 1999) und verhinderte die Bildung von PCR-Produkten, die durch unspezifische Bindung des SMART-Primers hervorgerufen werden können.

Trotz vielfältiger Variationen in Temperatur, der Anzahl von Zyklen aber auch der Konzentration verschiedener Komponenten des Reaktionsansatzes konnte mit den Primern GSP P18 (1 und 2) und GSP ME keine Produktbildung hervorgerufen werden. Demgegenüber ergab der Einsatz des GSP P62 Primers sowohl durch Einsatz des SMART-Primers als auch des UPM unter den gegebenen Bedingungen (Reaktionsansatz siehe 2.24.2, Temperaturprogramm siehe Tabelle 3.6 mit 52°C Annealingtemperatur bei Schritt 6 und 30 Zyklen der Schritte 5-7) ein spezifisches PCR-Produkt. Bei Trennung dieses PCR-Produktes im nicht-denaturierenden DNA-Agarosegel zeigte sich eine einzelne Bande im Bereich von ca. 1,1 kb (Abb. 3.36). Dieses Produkt entstand unabhängig davon, ob im Reaktionsansatz Gesamt-RNA oder aber Poly-A<sup>+</sup>-RNA eingesetzt wurde. Lediglich die Menge des amplifizierten Produktes lag im Ansatz mit Gesamt-RNA höher.

**Abb. 3.36:** Amplifikationsprodukt der 3'-RACE-PCR. Das mit dem Primer GSP P62 hergestellte Produkt wurde in einem 1% Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Spur 1: Produkt nach Verwendung von Gesamt-RNA (Auftrag: 12,5 µl des PCR-Ansatzes)

Spur 2: Produkt nach Verwendung von Poly-A<sup>+</sup>-RNA (Auftrag: 25 µl des PCR-Ansatzes)

Spur M: Vergleichs-DNA

### 3.10 Klonierung und Sequenzierung des 3'-RACE-PCR-Produktes von GSP P62

In Vorbereitung auf die anschließende Sequenzierung wurde das spezifische ca 1,1 kb große Produkt der Amplifikation mit dem GSP P62 (siehe Tab. 3.5) in den PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO Vektor kloniert. Dazu wurde das PCR-Produkt im 1%igen Agarosegel getrennt, die Bande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstück eluiert. Die gereinigte DNA wurde anschließend in den 3,9 kb großen Vektor ligiert. Mit diesem Konstrukt wurden *E. coli*-Zellen (Stamm DH5 $\alpha$ ) transformiert. Aus Übernachtskulturen transformierter *E. coli*-Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit Hilfe von Restriktionsanalysen auf das Vorhandensein von DNA-Insertionen der korrekten Größe untersucht. Für die anschließende Sequenzierung wurde je 1  $\mu$ g DNA der ca. 5 kb großen Plasmid-DNA eingesetzt.

Die ermittelte DNA-Sequenz setzte sich aus 1106 Nukleotiden zusammen, mit einem Stop-Codon (TAG) an Position 619-621 (siehe Abb. 3.37). Ausgehend von dem genspezifischen Primer, der von der N-terminalen Aminosäuresequenz (AS 7-15) des 62 kDa Polypeptids der PEPCK aus *E. siliculosus* abgeleitet wurde, ist ein Amplifikationsprodukt zu erwarten, welches für ein Polypeptid von mindestens 62 kDa codiert. Für die von der sequenzierten Nukleotidsequenz im entsprechenden Leserahmen übersetzten Aminosäuresequenz (von Nukleotid 1 bis zum Stop-Codon) ergibt sich jedoch nur eine molekulare Masse von ca. 21 kDa. Berücksichtigt man die ersten sechs Aminosäuren aus der N-terminalen Sequenzierung die zum Erstellen von Primern ungeeignet waren, erhöht sich die molekulare Masse zwar auf 21,5 kDa, es bleibt aber eine Differenz von mindestens 40 kDa zur zu erwartenden Polypeptidgröße.

	G I D K A T G I T V I G V N V P H E D F	20
1	GGGATCGACAAGGCGACGGGGATCACTGTCATCGGCGTCAACGTGCCCCACGAGGACTTC	
	K S Q A E A A L E A A D S S A P A A R S	40
61	AAGAGCCAAGCCGAGGCTGCTCTCGAGGCCGCGGACTCGTCCGCCCCCGCCGCTCGCTCG	
	P A K Y V G G E L R V K S D V G S T S V	60
121	CCCGCCAAGTACGTCGGGGGAGAGCTCAGGGTCAAGAGCGACGTGGGGTCCACGAGCGTG	
	F I A F A A P S G S D A S S P A Y E V L	80
181	TTCATTGCTTTTCGCGGCGCCCTCTGGCTCGGACGCAAGTTCCCCGGCCTACGAGGTCTCTC	
	G A L L G A R A R Q P P P P P L G S A C	100
241	GGAGCCCTCCTCGGCGCACGCGCGGCGGACGCCGCCCTCCGCTCTTGGTTTCAGCGTGT	
	S T R T P G S W A S P E P A P T G R R E	120
301	TCTACACGGACGCCGGGCTCGTGGGCGTCACCGGAACCTGCCCCAACGGGCAGGCGGGAG	
	R C R R R S L L L L G P S D G V Q R E V	140
361	CGCTGTGCGAGGCGCTCGCTCTTGCTTCTCGGGCCTAGCGACGGCGTCCAACGCGAAGTG	
	A S A I A S S K V S R A L K M E K P L Y	160
421	GCATCCGCGATCGCTTCTTCCAAGGTCAAGGTCGCCCTCAAGATGGAGAAGCCCTTGTAC	
	A L L A L A D S A S V G T D P A R A A T	180
481	GCCCTCCTCGCCCTGGCCGACTCTGCCTCCGTTGGCACGGACCCCGCAAGGGCGGCGACG	
	A L D G V T A A A V K K A A V P R S S R	200
541	GCCCTTGACGGTGTAACGGCAGCGCGGTCAAGAAGGCAGCGGTGCCGCGATCAAGTCGG	
	A C R W L L *	206
601	GCATGTCGATGGCTTCTGTAGGCAACATCTTGGAGGTACCGCAAAAGGCGGAGATCGTGG	
661	CAATGCTCTGACCCGGGGGGGGTGGGTCTAGACTACTAGTGGTTTCCTTTATCATAGCTCCC	
721	TTGGCGTTCTGCGGGCGAGAGGGGCACTTGTACGGGCTTGCTGGTGAAGGTCATGATGAT	
781	TTTTTTGTAGCTGCACCCCTAAATTTCTTCTCAAGACTGGATGGGAGGAGAAGATGGA	
841	GATGGGAAGGTTTCGAGACCCTGGGGGAGTTCTAGGACGCGTATTTTACCGCCATTACGT	
901	TTATTTGGTATGCACTTGATACAGAGTACTACAGCAGCAACAGGAGCTTTTCAATTTTGG	
961	TGCGTACGCCACGCGGGCCCCCGTATGGACTGCTGCTATCCTACGTTGTAAGAATCGAAT	
1021	CGTTTGGGTTTCCAGCGAGAGACCAATGAATGATGACGAGTGCTCGGTGCGTTTCTCGAA	
1081	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

**Abb. 3.37:** Nukleotidsequenz (untere Zeile, Nummerierung links) und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (obere Zeile, Nummerierung rechts) des mit dem GSP P62-Primer amplifizierten PCR-Produkts.

Vergleiche in Datenbanken sowohl auf Nukleinsäuresequenz- als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene ergaben weder zu PEPCK noch zu anderen Proteinen bzw. Genen anderer Organismen signifikante Ähnlichkeiten. So konnte mit dem Programm *Blast N 2.2.6* (ALTSCHUL et al., 1997) die größte Ähnlichkeit (mit einem *E value* von 1,9 (*Score* 42)) zu Nukleotidsequenzen aus *Homo sapiens* (Chromosom X clone XX-BAC 10326 mapX p11.4, komplette Sequenz), *Methanosarcina acetivorans* (str. C2A, Sektion 42 von 534 des kompletten Genoms) sowie *Streptomyces coelicolor* (A3(2) komplettes Genom) festgestellt werden.

Etwas größere Ähnlichkeit (mit einem *E value* von 0,96 (*Score* 36,2)) zeigte sich auf Ebene der übersetzten Aminosäuresequenz (*Blast X 2.2.6*); ALTSCHUL et al., 1997) zu einem unbekannten Protein aus *Arabidopsis thaliana* sowie zu einem vorhergesagten Protein aus *Neurospora crassa*.

## 4 Diskussion

Für zahlreiche Arten höherer Pflanzen liegen detaillierte Charakterisierungen und Funktionsbeschreibungen für die Enzyme PEPCK und NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym vor (siehe zusammenfassend: DRINCOVICH et al., 2001; WALKER UND CHEN, 2002). Demgegenüber sind nur einige biochemische und molekulare Parameter dieser Enzyme aus Phaeophyceen bekannt, die sich außerdem auf wenige (höhere) Arten beschränken und speziesspezifisch z.T. stark voneinander abweichen (AKAGAWA et al., 1972; KREMER und WILLENBRINK, 1972; KERBY und EVANS, 1983b; JOHNSTON und RAVEN, 1989; CABELLO-PASINI et al., 2000). Entscheidende Gründe hierfür liegen sicherlich in einigen biochemischen Besonderheiten der Braunalgen, die eine Präparation von Proteinen und deren anschließende Analysen erschweren. So steht einem hohen Gehalt an Polyphenolen, Polysacchariden und Alginaten, von denen bekannt ist, dass sie unspezifisch mit Proteinen interagieren (EVANS und HOLLIGEN, 1972; KOCH et al., 1980; JORDAN und VILTER, 1991), ein im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich geringerer Proteingehalt gegenüber (MARSDEN et al., 1981; KERBY UND RAVEN, 1985; KEEN et al., 1988). Trotz dieser Widrigkeiten gelang in dieser Arbeit die Isolation und Reinigung der Enzyme PEPCK und NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus der filamentösen Phaeophycee *Ectocarpus siliculosus*.

### 4.1 Funktion des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms

Die Präparation des gereinigten NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms zeigte im SDS-Polyacrylamidgel eine Proteinbande mit einer relativen molekularen Masse von 56 kDa. Die mittels Größenausschlusschromatographie ermittelte molekulare Masse für das native Enzym betrug 440 kDa. Basierend auf diesen Daten erscheint für dieses Braunalgen-ME eine Quartärstruktur aus acht identischen Untereinheiten am wahrscheinlichsten.

Auch für das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym aus *Escherichia coli* wurde ein Oktamer ( $M_r = 550$  kDa) aus identischen Untereinheiten nachgewiesen (SPINA et al., 1970). Demgegenüber treten die Enzyme anderer Bakterien als Monomere (in *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus casei*; LONDON et al., 1971), Dimere (in *Sulfolobus solfataricus*; BARTOLUCCI et al., 1987) oder Tetramere (in *Pseudomonas putida*; GARRIDO-PERTIERRA, 1983 oder *Clostridium thermocellum*; LAMED und ZEIKUS, 1981) auf. Für das Enzym aus *Bradyrhizobium japonicum* konnte gezeigt werden, dass es bei pH 7 als Tetramer, bei pH 8 hingegen als Dimer vorliegt (CHEN et al., 1997). Mit einer im Vergleich zum Enzym aus *E. siliculosus* wesentlich kleineren relativen molekularen Masse von

in der Regel 250 bis 270 kDa liegen die verschiedenen NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyme in Tieren (einschließlich des Menschen) als Homotetramere vor (siehe u. a. NEVALDINE et al., 1974; SWIERCZYNSKI, 1980; BUKATO et al., 1995). Für andere NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyme aus verschiedenen höheren Pflanzen wurden Konformationen aus vier bzw. sechs identischen Untereinheiten nachgewiesen (EDWARDS UND ANDREO, 1992; SAITOU et al., 1992; COLOMBO et al., 1997; FERREYRA et al., 2003). Ähnlich wie für das ME aus *Bradyrhizobium japonicum* konnte auch für das Enzym aus den Blättern von *Saccharum officinarum* eine pH-Wert-abhängige Konformationsänderung nachgewiesen werden. Während das Enzym bei pH 8 überwiegend in der tetrameren Form ( $M_r = 250$  kDa) vorliegt, zeigt sich bei pH 7 hauptsächlich ein 125 kDa großes Homodimer (IGLESIAS UND ANDREO, 1990).

Die gesonderte Stellung des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* bezüglich der Größe und Zusammensetzung des nativen Enzyms spiegelt sich auch in der Größe der monomeren Einheit wider. Diese ist mit 56 kDa kleiner als alle bisher beschriebenen NADP<sup>+</sup>-ME-Untereinheiten aus tierischem und menschlichem Gewebe. Die Größe der bislang aus Bakterien isolierten Enzym-Untereinheiten reicht von 40 kDa bei *Clostridium thermocellum* (LAMED UND ZEIKUS, 1981) bis hin zu 77 kDa bei *Bradyrhizobium japonicum* (CHEN et al., 1997). Dabei liegt die Untereinheit aus *Pseudomonas putida* mit einer Größe von 52 kDa (GARRIDO-PERTIERRA et al., 1983) der aus *E. siliculosus* am nächsten. Letztere ist mit 56 kDa auch kleiner als alle bisher beschriebenen NADP<sup>+</sup>-ME-Untereinheiten aus höheren Pflanzen.

Aufgrund ihrer Funktion und Lokalisation werden die unterschiedlichen Isoformen des NADP<sup>+</sup>-MEs aus höheren Pflanzen in photosynthetische bzw. nicht-photosynthetische plastidäre oder cytoplasmatische Enzyme klassifiziert (DRINCOVICH et al., 2001). ME-Untereinheiten mit der kleinsten molekularen Masse gehören zur Gruppe der photosynthetischen Isoformen. Diese 62 bis 67 kDa großen Polypeptide sind in Chloroplasten der Bündelscheidenzellen von C<sub>4</sub>-Pflanzen zu finden (IGLESIAS UND ANDREO, 1990; MAURINO et al., 1996; CASATI et al., 1999). Demgegenüber sind die photosynthetischen Isoformen in CAM-Pflanzen im Cytosol lokalisiert und weisen eine Größe von 64-65 kDa auf (WINTER et al., 1982; SAITOU et al., 1992; HONDA et al., 2000).

Bis vor kurzem wurden ME-Isoformen mit einer molekularen Masse von 72 kDa aus Blättern und Wurzeln von CAM-, C<sub>4</sub>- und C<sub>3</sub>-Pflanzen sowie aus etioliertem Gewebe von C<sub>4</sub>-Pflanzen ausschließlich als nicht-photosynthetisch charakterisiert (MAURINO et al., 1997; DRINCOVICH et al., 1998; HONDA et al., 2000). FERREYRA et al. (2003) identifizierten jedoch kürzlich eine Untereinheit gleicher Größe aus Blättern der CAM-Pflanze *Aptenia cordifolia* als offensichtlich photosynthetische Isoform.

Dieser Vergleich verdeutlicht, dass die molekulare Masse des Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* allein nicht geeignet ist, um Rückschlüsse auf eine mögliche Zugehörigkeit des Enzyms zu einer der beschriebenen Isoformklassen höherer Pflanzen zu ziehen. Als in dieser Hinsicht aussagekräftiger erwiesen sich Vergleiche kinetischer Parameter. Bezüglich der  $K_m$ -Werte für Malat und  $\text{NADP}^+$  zeigte das Enzym der Alge eine große Ähnlichkeit zu der photosynthetischen Isoform der "fakultativen" CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum*. Dem  $K_m$ -Wert von 0,35 mM (bei pH 7.2) des Enzyms aus *M. crystallinum* (SAITOU et al., 1992) entsprach ein  $K_m$ -Wert von 0,36 mM (bei pH 7.5) des Enzyms aus *E. siliculosus*. Für Malat-Enzyme anderer höherer Pflanzen wurden Malat-Bindekinetiken ermittelt, die - wie bei *M. crystallinum* und *E. siliculosus* - einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik folgten, oder aber negative bzw. positive Kooperativität zeigten (EDWARDS UND ANDREO, 1992; DRINCOVICH et al., 2001). Generell zeigen die MEe aus  $\text{C}_4$ -Pflanzen eine höhere Affinität zu Malat als das der Alge. Demgegenüber wurden für  $\text{C}_3$ -Pflanzen, aber auch für die obligate CAM-Pflanze *Aptenia cordifolia*, eine z.T. mehr als 10-fach geringere Affinität zu Malat bestimmt (DRINCOVICH et al., 1991; CASATI et al., 1997; 1999; 2000; FERREYRA et al., 2003).

Im weiteren Vergleich konnte auch für die Decarboxylierungsaktivität des Malat-Enzyms als Funktion der  $\text{NADP}^+$ -Konzentration große Ähnlichkeit zwischen dem Enzym aus *E. siliculosus* und *M. crystallinum* festgestellt werden. So zeigen beide Enzyme in Abhängigkeit zur  $\text{NADP}^+$ -Konzentration eine sigmoidale Reaktionskinetik. Die in der Hill-Auftragung ermittelten Koeffizienten von 2,0 (*M. crystallinum*; SAITOU et al., 1992) und 2,74 (*E. siliculosus*) wiesen in beiden Fällen auf das Vorliegen von positiver Kooperativität hin. Im Gegensatz dazu stehen die einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik folgenden hyperbolischen Kurvenverläufe für die Enzyme zahlreicher  $\text{C}_4$ - und  $\text{C}_3$ -Pflanzen sowie von *Aptenia cordifolia*, für die kein kooperatives Verhalten bei der Anlagerung von  $\text{NADP}^+$  nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt zeigen alle der bis dato untersuchten Malat-Enzyme einschließlich dem aus *E. siliculosus* eine hohe Affinität zu  $\text{NADP}^+$  mit  $K_m/S_{0,5}$ -Werten im mikromolaren Bereich. Diese Eigenschaft sowie Übereinstimmungen aus Proteinvergleichen wurden als Hinweis gewertet, dass es sich bei der Bindungsstelle für  $\text{NADP}^+$  um einen durch die Evolution hindurch erhaltenen Sequenzbereich handelt (ROTHERMEL UND NELSON, 1989). Diese Vermutung konnten DRINCOVICH et al. (2001) durch Aminosäuresequenz-Vergleiche auf der Basis von cDNA-Sequenzen für 18 ME-Isoformen bestätigen.

Trotz der artübergreifend konservierten  $\text{NADP}^+$ -Bindestelle zeigen Enzyme aus  $\text{C}_4$ -Pflanzen gegenüber denen aus  $\text{C}_3$ - und CAM-Pflanzen (einschliesslich *E. siliculosus*) eine leichte, aber dennoch eindeutig erhöhte Affinität zu  $\text{NADP}$ . Auch die cytosolischen und mitochondrialen

NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyme aus diversen tierischen und menschlichen Geweben zeigen eine den Enzymen aus C<sub>4</sub>-Pflanzen ähnlich hohe Affinität zu NADP<sup>+</sup>. Diese liegt etwa um den Faktor zehn über der der Enzyme aus C<sub>3</sub>- und CAM-Pflanzen sowie aus *E. siliculosus* (SWIERCZYNSKI, 1980; BUKATO et al., 1995; KUO et al., 2000; DRINCOVICH et al., 2001).

Außer für die K<sub>m</sub>-Werte ergaben sich auch für das pH-Optimum der Decarboxylierungsreaktion der verschiedenen Malat-Enzyme ebenso wie für deren spezifische Aktivität signifikante Unterschiede zwischen C<sub>4</sub>-, CAM-, und C<sub>3</sub>-Pflanzen sowie Tieren und Bakterien. So wurden bei Bakterien (siehe u. a. SPINA et al., 1970; GARRIDO-PERTIERRA et al., 1983), tierischem Gewebe (siehe u. a. CHANG und CHANG, 1982; BUKATO et al., 1995), C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen (DRINCOVICH et al., 2001) wesentlich höhere spezifische Aktivitäten der gereinigten Enzyme festgestellt als für die Enzyme aus C<sub>3</sub>-Pflanzen (CASATI et al., 1997; 2000) bzw. aus etiolierten Blättern (MAURINO et al., 1996) und Wurzeln (MAURINO et al., 2001) von Mais. Mit einer spezifischen Aktivität von 5,65 U/mg ähnelt das ME aus *E. siliculosus* eher dem der C<sub>3</sub>-Pflanzen. Andererseits nimmt das Enzym wie das der C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-Spezies *Flaveria floridana* mit einem pH-Wert von 7.5 eine intermediäre Stellung bezüglich des pH-Optimums ein. Während das pH-Optimum der photosynthetischen Enzyme von C<sub>4</sub>-Pflanzen um pH 8 angesiedelt ist, liegt es bei den von CAM und C<sub>3</sub>-Pflanzen im Bereich von pH 7 (DRINCOVICH et al., 2001). Auch die nicht-photosynthetischen Isoformen aus Mais zeigen ein pH-Optimum bei pH 7.5 (MAURINO et al., 1996; 2001). Für die NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyme zahlreicher tierischer sowie menschlicher Gewebe wurde gezeigt, dass sich das pH-Optimum der Decarboxylierungsreaktion mit der Malat-Konzentration ändert (SWIERCZYNSKI, 1980; ZELEWSKI und SWIERCZYNSKI, 1991; BUKATO et al., 1995). Ausserdem zeigen diese Enzyme (insbesondere die mitochondriellen) überwiegend höhere Aktivitäten bei der Katalyse mit Mn<sup>2+</sup>-Ionen (LIN und DAVIS, 1974; BUKATO et al., 1995), während die NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyme aus Pflanzen und das aus *E. siliculosus* höhere Aktivitäten unter Einsatz von Mg<sup>2+</sup>-Ionen zeigen (WEDDING, 1989; BUSCH, 1998).

Zusammenfassend kann für das ME aus *E. siliculosus* festgestellt werden, dass die Ähnlichkeit zu den photosynthetischen Isoformen aus C<sub>4</sub>-Pflanzen sehr begrenzt ist. Tendenziell bestehen eher Übereinstimmungen mit Enzymen aus C<sub>3</sub>-Pflanzen und im höheren Maße zu intermediären Isoformen wie von *Flaveria floridana* bzw. zu "induzierbaren" Formen wie im Fall von *Mesembryanthemum crystallinum* (wo durch Salz- und Trockenstress ein Übergang von C<sub>3</sub>-Photosynthese zu Crassulaceen-Säure-Metabolismus ausgelöst werden kann; SAITOU et al., 1994). Mit der Induktion des CAM geht dabei eine erhöhte Expression des NADP<sup>+</sup>-Malat-

Enzyms als Folge einer Erhöhung der Transkriptionsrate des entsprechenden Gens einher (CUSHMAN, 1992).

Die photosynthetischen ME-Isoformen in C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen katalysieren die Decarboxylierung von Malat und stellen so CO<sub>2</sub> für anschließende Fixierungsreaktionen der Rubisco bereit. Die Funktionen nicht-photosynthetischer NADP-ME-Isoformen erscheinen vielfältiger. Ihre Verbreitung erstreckt sich über verschiedene Gewebearten in C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>-, und CAM-Pflanzen (EDWARDS und ANDREO, 1992; DRINCOVICH et al., 2001). Aufgrund dieser allgegenwärtigen Präsenz wird ihnen die Funktion eines anaplerotischen Enzyms zugeschrieben (*housekeeping*-Funktion), welches zum einen die Lieferung von NADPH und Pyruvat katalysiert und zum anderen an der Atmung partizipiert (EDWARDS und ANDREO, 1992). Desweiteren wurde bereits 1979 von PUPILLO und BOSSI die Mitwirkung einer cytosolischen ME-Isoform aus Maisblättern bei der intrazellulären pH-Regulierung vorgeschlagen (siehe auch EDWARDS und ANDREO, 1992). Neuere Vorschläge zu intrazellulären pH-Regulationsmechanismen, die eine "alternative pathway oxidation" postulieren, unterstützen die Idee der Mitwirkung von Malat-Enzym (und PEPC und PEPCK) an einem pH-Stabilisierungsmechanismus (SAKANO, 1998). Da jedoch in dem von SAKANO vorgeschlagenen Modell der pH-Kontrolle ein pH-Optimum des Malat-Enzyms im sauren Bereich vorausgesetzt wird, erscheint für das ME aus *E. siliculosus* mit einem pH-Optimum von 7,5 die Einbeziehung in einen solchen pH-Stabilisierungsmechanismus eher unwahrscheinlich.

Schon länger ist bekannt, dass Malat-Enzyme an der Lieferung von NADPH für diverse cytologische Prozesse beteiligt sind (EDWARDS und HUBER, 1981). Beispielsweise konnte für Bohnen gezeigt werden, dass mit Hilfe des MEs die NADPH-Versorgung für eine erhöhte Ligninbiosynthese in verwundeten Blättern sichergestellt wird. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch UV-B-Bestrahlung die Induktion eines cytosolischen NADP-Malat Enzyms in Bohnen ausgelöst werden kann (PINTO et al., 1999). Dies steht im Zusammenhang mit der Bereitstellung von NADPH für die Biosynthese von Lignin und Flavonoiden zur pflanzlichen Verteidigung (SCHAAF et al., 1995).

Da jedoch das ME aus *Ectocarpus* nach bisherigen Erkenntnissen nicht induziert wird und allenfalls circadian expremiert wird (BUSCH, 1998), gibt es keine argumentative Grundlage für eine vergleichbare Beteiligung dieses Enzyms an einem Abwehrmechanismus.

Da in dieser Arbeit die immunologischen und molekularbiologischen Ansätze zur Klärung der Funktion des Malat-Enzyms nicht zum Erfolg führten, sind weiterführende Untersuchungen nötig, um Aussagen über zusätzliche physiologische und molekulare Eigenschaften sowie seine Lokalisation treffen zu können.



## 4.2 Funktion der PEPCK

Im Gegensatz zum NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym, für welches bis auf eine Ausnahme - eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität in einem Rohextrakt von *Spatoglossum pacificum* (AKAGAWA et al., 1972) - keine Daten aus Braunalgen vorliegen, war die PEPCK aus Phaeophyceen wiederholt Gegenstand von Untersuchungen (AKAGAWA et al., 1972; KERBY und EVANS, 1983a; b; JOHNSTON und RAVEN, 1989, CABELLO-PASINI et al., 2000).

Das Enzym aus *E. siliculosus* wurde im Rahmen dieser Arbeit 174-fach aufgereinigt. Die elektrophoretische Trennung der gereinigten Präparation ergab im SDS-Polyacrylamidgel eine Proteinbande bei 62 kDa sowie, stets parallel dazu auftretend, eine zweite, in der Regel intensiv gefärbte Bande bei 18 kDa. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass diese beiden Banden Untereinheiten der nativen PEPCK repräsentieren. Dieser Erklärungsansatz erscheint jedoch sowohl im Hinblick auf die Größe des nativen Proteins als auch auf Ergebnisse aus Untersuchungen mit dem Antikörper gegen das 18 kDa Polypeptid eher unwahrscheinlich.

Mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie wurde für die native PEPCK eine relative molekulare Masse von ca. 90 kDa ermittelt. Ginge man davon aus, dass es sich bei den durch SDS-PAGE getrennten Polypeptidbanden um Untereinheiten des Enzyms handelt, so würde man für das native Protein eine molekulare Masse von ca. 80 kDa erhalten. Es fehlen also 10 kDa zur tatsächlichen Größe der nativen PEPCK. Außerdem konnte unter Einsatz des Antikörpers gegen das 18 kDa-Polypeptid eine Kreuzreaktion mit der 62 kDa-Bande nachgewiesen werden. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, dass sich zumindest ein Teil des 18 kDa-Polypeptids im 62 kDa-Polypeptid wiederfinden lässt und daher nicht eine separate Untereinheit darstellt. Ob das gesamte 18 kDa-Fragment einen Teil des 62 kDa-Polypeptids bildet, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Es scheint aber wahrscheinlich, dass es sich bei dem 18- und 62 kDa-Polypeptid jeweils um Degradationsprodukte handelt. Diese Erklärung findet auch in der Tatsache Unterstützung, dass sich bei einer erneuten Größenausschlusschromatographie der gereinigten nativen PEPCK Elutionspeaks geringerer molekularer Masse (62, 30 und 18 kDa) ergaben. Dies war mit dem Verschwinden des 90 kDa-Peaks und dem Verlust der enzymatischen Aktivität verbunden. Dabei ist zu bemerken, dass im Gegensatz zu den beiden anderen stets präsenten Polypeptiden ein 30 kDa-Fragment nur sehr selten in SDS-Gelen auftrat und deshalb im Folgenden nicht weiter untersucht wurde.

Ein Merkmal der PEPCK aus Blütenpflanzen könnte als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich zumindest bei dem 18- und 62 kDa-Polypeptid um Proteolyseprodukte und nicht um Untereinheiten der PEPCK aus *E. siliculosus* handelt. So zeigen PEPCKs verschiedener

Blütenpflanzen während der Extraktion regelmäßig den Verlust ihres N-terminalen Endes (ca. 12 kDa; KIM und SMITH, 1994; FINNEGAN und BURNELL, 1995; WALKER et al., 1995).

Auch für andere Enzyme gibt die Literatur zahlreiche Hinweise eines proteolytischen Zerfalls im Rohextrakt, beispielsweise für Rubisco (USADA und SHIMOGAWARA, 1994), für ADP-Glucose-Phosphorylase (KLECZKOWSKI et al., 1993), NADP-Malat-Dehydrogenase (KAMPFENKEL, 1992) und PEP-Carboxylase (BAUR et al., 1992; USADA und SHIMOGAWARA, 1994). Oft, wie auch im Fall der PEPCK höherer Pflanzen, tritt dieser Zerfall auf, ohne die maximale Aktivität ( $V_{\max}$ ) des Enzyms zu beeinträchtigen.

Für die PEPCK der Blütenpflanzen konnte gezeigt werden, dass die proteolytischen Reaktionen auftreten, wenn die Extraktion des Enzyms in einem pH-Bereich von acht oder darunter vorgenommen wird. Hingegen kann bei Extraktionen bei einem pH-Wert von neun und darüber der Zerfall des Proteins verhindert werden (WALKER und LEEGOOD, 1995; WALKER et al., 1997; WALKER et al., 2002). Zur Stabilisierung der Enzymaktivität der PEPCK aus *E. siliculosus* war es jedoch nötig, die Extraktion bei pH 8 durchzuführen (BUSCH, 1998). Ob der pH-Wert auch bei dieser PEPCK-Isoform einen proteolytischen Zerfall begünstigt und inwieweit auch hier eine pH-abhängige Stabilisierung des isolierten Moleküls möglich wäre, bleibt zu überprüfen.

Obwohl die PEPCK aus Braunalgen mehrfach Gegenstand z.T. intensiver Untersuchungen war, existieren nur sehr wenige und widersprüchliche Daten über ihre molekulare Masse. So bestimmten KERBY und EVANS (1983b) für das native Protein aus *Ascophyllum nodosum* durch Größenausschlusschromatographie einen Wert von 60 kDa. Nach Trennung dieser Präparation im SDS-Gel ergab sich eine einzelne Bande im gleichen Größenbereich, weshalb auf das Vorliegen eines Monomers geschlossen wurde. Die Trennung einer anderen, nur partiell gereinigten PEPCK-Präparation der gleichen Alge in Gradientengelen ergab fünf Protein-Banden im Bereich von 95 bis 615 kDa (JOHNSTON und RAVEN, 1989) und es wurde geschlossen, dass das von KERBY und EVANS (1983b) gereinigte 60 kDa-Polypeptid eine Untereinheit eines Protein-Komplexes von größerer molekularer Masse darstellen könnte.

Der Versuch von CABELLO-PASINI et al. (2000), PEPCK aus *Laminaria setchellii* zu isolieren schlug aufgrund zu geringer Ausbeuten und einer ungenügenden chromatographischen Auflösung - die dem hohen Gehalt saurer Polyphenole zugeschrieben wurde - fehl. Jedoch gelang die Reinigung des Enzyms aus der marinen Diatomee *Skeletonema costatum*. Die mittels Gelfiltration ermittelte molekulare Masse dieses Proteins betrug 87 kDa und die anschließende Trennung der nativen PEPCK im denaturierenden Acrylamidgel ergab eine Bande bei 43 kDa. Daraus wurde auf das Vorliegen eines Homodimers geschlossen. Antikörper gegen die denaturierte Form des Enzyms zeigten in Immunoblot-Experimenten eine Kreuzreaktion mit

einem 43 kDa-Polypeptid aus dem Rohextrakt der Braunalge *Laminaria setchellii* sowie von vier weiteren Phaeophyceen.

In neueren Immunoblot-Untersuchungen wiesen WALKER und CHEN (2002) nach, dass ein Antikörper gegen PEPCK aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Panicum maximum* (WALKER et al., 2002) Antigenität gegenüber einem 62 kDa Polypeptid aus den Extrakten von *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus* und *Laminaria saccharina* zeigt. Für die intakte PEPCK aus *P. maximum* selbst wurde nach SDS-PAGE eine Größe von 71 kDa ermittelt (WALKER et al., 2002). Demgegenüber tritt die PEPCK in CAM- und C<sub>3</sub>-Pflanzen stets als 74 kDa großes Protein auf (ausgenommen einiger *Tillandsia*-Arten, mit 78 kDa; WALKER und LEEGOOD, 1996). Die Größe des Moleküls in C<sub>4</sub>-Pflanzen variiert dagegen beträchtlich und reicht von 67 kDa (einige Gräser) bis zu 74 kDa (in Maisblättern; WALKER et al., 1997). In früheren Untersuchungen wurden PEPCK-Moleküle aus verschiedenen C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen isoliert und eine molekulare Masse von 62 kDa ermittelt. Wie WALKER später zeigen konnte, handelte es sich hierbei um Abbauprodukte, die entstanden, wenn die Extraktionen bei pH-Werten unter neun durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen kam es zu dem bereits erwähnten Verlust des N-terminalen Endes (ca. 12 kDa; WALKER et al., 1995).

Wie dargelegt wurde, besteht bezüglich der für die native PEPCK aus *E. siliculosus* bestimmten relativen molekularen Masse von 90 kDa eine große Ähnlichkeit zu dem für das Enzym aus *Skeletonema costatum* ermittelten Wert von 87 kDa. Als ebenfalls dazu passend könnte die von JOHNSTON und RAVEN (1989) durch Elektrophorese im Acrylamidgradientengel erhaltene 95 kDa-Bande der PEPCK-Präparation von *Ascophyllum nodosum* gewertet werden. Diese Werte weichen jedoch deutlich von dem von KERBY und EVANS (1983b) für die gleiche Alge mittels Gelfiltration ermittelten Wert von 60 kDa ab.

Widersprüchlich sind die Angaben über die molekulare Masse der Braunalgen-PEPCK in danaturierenden SDS-Gelen. Einerseits ist von CABELLO-PASINI et al (2001) für mehrere Arten ein Wert von 43 kDa bestimmt worden, andererseits wurde in dieser Arbeit für *E. siliculosus* ein Wert von 62 kDa bestimmt, der, wie oben diskutiert, wahrscheinlich zu einem Degradationsprodukt gehört. Entsprechende Werte erhielten auch WALKER und CHEN (2002) für eine Reihe von Phaeophyceen höherer Organisation.

Sehr ähnlich dazu ist der von KERBY und EVANS (1983b) bestimmte Wert von 60 kDa für *Ascophyllum nodosum*. Außerdem wurde bereits 1977 von HOLDSWORTH und BRUCK für die PEPCK aus der Diatomee *Phaeodactylum nodosum* eine molekulare Masse von 62 kDa ermittelt. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass sich die molekularen Massen von Enzymen so nah verwandter Arten (gleiche Gattung: *Laminaria saccharina* und *L. setchellii*) derartig

unterscheiden. Da es sich bei der 62 kDa-Bande um ein Degradationsprodukt handeln muss, dürfte auch das 43 kDa-Peptid durch Degradation während der Präparation entstanden sein. Wie bei der Reinigung des Enzyms aus höheren Pflanzen (WALKER et al., 1995) wäre so die Größe des entstehenden Produkts abhängig von der Reinigungsmethode. Ob es auch hier der pH-Wert des Isolierungspuffers ist, der einen solchen Effekt bewirkt, bleibt zu prüfen.

Mit einer nativen molekularen Masse von 90 kDa und einer molekularen Masse von 62 kDa des größten Peptids in der denaturierenden Elektrophorese ist für das Enzym aus *E. siliculosus* eine dimere Natur, wie sie von CABELLO-PASINI et al. (2000) für die PEPCK aus *S. costatum* vorgeschlagen wurde, sehr unwahrscheinlich; zumindest gibt es keine Befunde, die auf das Vorliegen eines Dimers hindeuten.

**Tabelle 4.1:** Vergleich kinetischer Parameter der PEPCK aus *Ectocarpus siliculosus* mit denen anderer Phaeophyceen und der Diatomee *Skeletonema costatum*

Alge	Referenz	pH-Optimum	Spez. Aktivität (U/mg)	$K_m$ (mM) $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$	$K_m$ (mM) PEP	$K_m$ (mM) ADP	Messbedingungen
<i>Ascophyllum nodosum</i>	JOHNSTON und RAVEN, 1989	6.8-7.0	0,268	$\text{HCO}_3^- = 1,084$ $\text{CO}_2 = 0,48$	0,077	0,035	pH 7.0; 25°C pH 8.5; 25°C
<i>Ascophyllum nodosum</i>	KERBY und EVANS, 1983b	7.9	0,251	$\text{HCO}_3^- = 50$	0,036	0,0116	pH 7.9; 25°C
<i>Dictyota dichotoma</i>	AKAGAWA et al., 1972	7.3		$\text{HCO}_3^- = 10$	0,3	0,07	pH 7.0; 30°C
<i>Spatoglossum pacificum</i>	AKAGAWA et al., 1972	7.3		$\text{HCO}_3^- = 10$	0,2	0,08	pH 7.0; 30°C
<i>Laminaria setchellii</i>	CABELLO-PASINI, et al., 2000	7,2		$\text{HCO}_3^- = 3,02$	0,20	0,03	pH 7.2; 24°C
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	diese Arbeit; BUSCH, 1998	7.0		$\text{HCO}_3^- = 11,31$ $\text{CO}_2 = 1,46$	0,5	0,23	pH 7.0; 25°C
<i>Skeletonema costatum</i>	CABELLO-PASINI, et al., 2000	7.2	0,7	$\text{HCO}_3^- = 28,88$	0,18	0,004	pH 7.2; 24°C

Vergleiche der  $K_m$ -Werte für die PEPCK aus verschiedenen Braunalgen zeigen insbesondere für das Substrat  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  zum Teil gravierende Unterschiede (Tabelle 4.1). Dabei ist zu berücksichtigen, dass für die verschiedenen Spezies die Substratabhängigkeiten des Enzyms unter voneinander abweichenden Assay-Bedingungen ermittelt wurden. So variierte beispielsweise der pH-Wert in den Assays zwischen 7.0 und 8.5. Dass eine direkte Abhängigkeit des  $K_m$ -Wertes für  $\text{CO}_2$  vom pH-Wert besteht, wiesen JOHNSTON und RAVEN (1989) für die PEPCK aus *Ascophyllum nodosum* nach. Dabei verursacht eine Erhöhung des pH-Wertes im

Assay eine Erniedrigung des  $K_m$ -Wertes. Auch Mangan wurde in den Assays als Cofaktor in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Im Allgemeinen liegen die in den Assays eingesetzten  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen ( $\geq 4$  mM) weit über den in Pflanzen- und Tierzellen vorzufindenden physiologischen (submicromolaren) Konzentrationen (QUIQUAMPOIX et al., 1993). Für die PEPCK aus *Panicum maximum* zeigten CHEN et al. (2002), dass der  $K_m$ -Wert für  $CO_2$ , der unter Einsatz physiologischer  $Mn^{2+}$ - (und physiologischer  $Mg^{2+}$ -) Konzentration bestimmt wurde (10  $\mu M$   $Mn^{2+}$  und 4 mM  $Mg^{2+}$ ), dreizehnmal größer war als bei einer Konzentration von 5 mM  $Mn^{2+}$ . Auch für das Enzym aus *E. siliculosus* deutete sich in ersten Testversuchen an, dass sich bei Einsatz geringerer  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen (40  $\mu M$ ) eine höhere Affinität des Enzyms zu  $CO_2$  ergibt (ohne Abbildung). Da die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bei solch niedrigen  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen aber zu sehr geringen Aktivitätswerten führte, wären größere Mengen gereinigten Enzyms nötig gewesen, um eine in dieser Hinsicht zweifelsfreie Aussage treffen zu können. Für andere Braunalgen liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Jedoch zeigten JOHNSTON und RAVEN (1989) für die PEPCK aus *Ascophyllum nodosum*, dass eine Aktivierung der Carboxylierungsaktivität des Enzyms durch Präinkubation (10-15 min) mit  $Mn^{2+}$  allein oder in Verbindung mit  $HCO_3^-$  bzw. ADP hervorgerufen werden kann. In einem entsprechenden Versuchsansatz konnte diese Eigenschaft für das Enzym aus *Ectocarpus* jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ein weiterer Faktor, der einen Vergleich von  $K_m$ -Werten erschwert, ist die Änderung der Eigenschaften des Enzyms, die sich bei unterschiedlichen Extraktions- und Reinigungsverfahren ergeben.

Wie die PEPCK höherer Pflanzen (BURNELL, 1986; CHEN et al., 2002) zeigt auch das Enzym aus *E. siliculosus* und anderen Braunalgen eine absolute Abhängigkeit von  $Mn^{2+}$ -Ionen und ADP (Akagawa et al., 1972; JOHNSTON und RAVEN, 1989; BUSCH, 1998; CABELLO-PASINI et al., 2000), obwohl zumindest die Enzyme einiger höherer Pflanzen auch GTP nutzen können, dann allerdings eine verminderte Aktivität aufweisen (WALKER und CHEN, 2002). Bei dem Enzym aus *E. siliculosus* konnte ADP nicht durch GDP ersetzt werden (ohne Abbildung).

Im Vergleich zu der durch Aussalzchromatographie teilgereinigten PEPCK zeigt das nahezu reine Enzym aus *E. siliculosus* eine ca. 4-fach höhere Affinität zu  $CO_2$ . Demgegenüber ergibt sich sowohl für den  $K_m$ -Wert für PEP als auch für den für ADP kein nennenswerter Unterschied. Als Ursache für die erhöhte Affinität fast reiner PEPCK zu  $CO_2$  könnte eine mit der Aufreinigung verbundene Entfernung von Komponenten gesehen werden, die mit dem Enzym im grob vorgereinigten Extrakt interagieren und so die Bindung zu  $CO_2$  erschweren.

Beim Vergleich der  $K_m$ -Werte für die PEPCK aus anderen Braunalgen ergeben sich insbesondere für den Wert von  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  z. T. gravierende Unterschiede (siehe Tab. 4.1). Zwar verursachen bei Blütenpflanzen weder die unter bestimmten Extraktionsbedingungen hervorgerufene Phosphorylierung des N-terminalen Endes der PEPCK noch der Verlust dieses Phosphatrests eine Änderung der Affinität des Enzyms zu  $\text{CO}_2$  (WALKER et al., 2002), es ist aber nicht auszuschließen, dass durch Proteolyse hervorgerufene Proteinänderungen die Affinität der PEPCK zu ihren Substraten beeinflusst. Auch ist eine Veränderung der Affinität allein aufgrund von unterschiedlichen Oxidations- bzw. Reduktionszuständen des Enzyms denkbar. So ist beispielsweise auch der Wert für die spezifische Aktivität der PEPCK höherer Pflanzen stark vom Oxidationszustand der  $-\text{SH}$ -Gruppen des Enzyms abhängig (CHEN et al., 2002). Dies erschwert den Vergleich der spezifischen Aktivität der PEPCK aus unterschiedlichen Organismen. Tendenziell erscheint die spezifische Aktivität der PEPCK höherer Pflanzen mit 30-60 U/mg Protein wesentlich (bis zu 200-fach) über den Werten des Enzyms von Braunalgen (auch *E. siliculosus*) zu liegen (BURNELL, 1986; WALKER et al., 2002; JOHNSTON und RAVEN, 1989; KERBY und EVANS, 1983b). Ob diese Diskrepanz als Ergebnis einer Inaktivierung während der Extraktion zu sehen ist, ist offen.

### 4.3 Immunologische Verwandtschaft der PEPCK

Für gereinigte PEPCK aus *E. siliculosus* zeigte sich nach elektrophoretischer Trennung im SDS-Acrylamidgel eine Bande im Bereich von 62 kDa sowie eine zweite, prominentere bei 18 kDa. Im mittels SDS-PAGE getrennten und auf PVDF-Membran geblotteten Rohextrakt aus *E. siliculosus* konnten beide Banden mit einem Antikörperserum gegen das 18 kDa Polypeptid detektiert werden. Die gleichzeitige Detektion einer ca. 23 kDa großen Bande (Abb. 3.19) kann nicht als PEPCK-spezifisch gewertet werden, da diese im Gegensatz zu den beiden anderen auch auftrat, wenn die Inkubation mit Präimmunserum durchgeführt wurde.

In Immunpräzipitationsstudien wurde auch die native PEPCK durch den Antikörper gegen das 18 kDa Polypeptid erkannt (Abb. 3.16). Dass die Immunpräzipitation der PEPCK nicht gleichzeitig auch zur Hemmung der enzymatischen Aktivität führte, legt den Schluss nahe, dass das Epitop, an welches der Antikörper spezifisch bindet, nicht im bzw. nicht in funktioneller Nähe des katalytischen Zentrums des Enzyms liegt. Die Bindung des Antikörpers löste offenbar auch keine Konformationsänderungen des Enzyms aus, die die katalytische Funktion der PEPCK beeinträchtigte.

Versuche, die PEPCK aus *E. siliculosus* mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Enzym aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Urochloa panicoides* (hergestellt von FINNEGAN und BURNELL, 1995) im Immunoblot nachzuweisen, schlugen fehl (siehe Abb. 3.12 Spur 4). Als Ursache wurde zunächst eine zu geringe Homologie der PEPCK aus Braunalgen und der höherer Pflanzen vermutet.

Dies gilt nicht grundsätzlich für alle Enzyme, denn sowohl die große als auch die kleine Untereinheit der Rubisco aus *E. siliculosus* waren mit einem Antikörper gegen das Enzym aus Spinat in Immunoblotversuchen nachzuweisen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Rubisco im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen als stark konserviertes Protein auftritt. So erhielten auch CABELLO-PASINI et al. (2001) mit einem Antikörper gegen Rubisco aus *Zea mays* bei allen getesteten Arten der Chlorophyta, Rhodophyta, Anthophyta sowie auch Phaeophyta eine Kreuzreaktion mit einem 56 kDa großen Polypeptid (entsprechend der großen Untereinheit der Rubisco). Gleichzeitig ergaben aber Tests, bei denen ein Antikörper gegen die PEPCK der Diatomee *Skeletonema costatum* eingesetzt wurde, Kreuzreaktionen ausschließlich mit Polypeptiden aus Braunalgen. Die Ursache dafür liegt wohl weniger, wie die Autoren vermuteten, in einem Fehlen der PEPCK bei Chloro- und Rhodophyten. - Auch wenn KREMER und KÜPPERS (1977) bei verschiedenen Arten beider Algenstämme keine nennenswerten PEPCK-Aktivitäten nachweisen konnten, wurden in späteren Untersuchungen beträchtliche Mengen an PEPCK in der Grünalge *Udotea flabellum* gefunden (REISKIND et al., 1988). Auch in einigen Rotalgen wurde in späteren Studien PEPCK nachgewiesen (HOLBROOK et al., 1988; ISRAEL et al., 1991).- Vielmehr lassen diese Untersuchungen darauf schließen, dass sich die PEPCK der Phaeophyceen strukturell z.T. entscheidend von den Enzymen aus anderen Algenklassen sowie denen höherer Pflanzen, die eine phylogenetisch nahe Verwandtschaft zu Grünalgen aufweisen, unterscheiden. Auch in den Experimenten dieser Arbeit reagierte der Antikörper gegen das 18 kDa-Polypeptids der PEPCK aus *E. siliculosus* nicht mit Polypeptiden im Rohextrakt aus Mais, Spinat und *Kalanchoë* (ohne Abbildung).

Dass dennoch eine gewisse strukturelle Verwandtschaft besteht, zeigen neuere Untersuchungen von WALKER UND CHEN (2002), in denen ein Antikörper gegen die PEPCK aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Panicum maximum* mit einem 62 kDa Polypeptid aus Rohextrakt von *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus* sowie *Laminaria saccharina* kreuzreagierte. Aufgrund der Größe von 62 kDa des einzig detektierten Polypeptids schlossen die Autoren, dass das Braunalgenenzym nicht die N-terminale Extension besitzt, die typisch für das Enzym aus Blütenpflanzen ist (WALKER et al., 1995). Für letzteres konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass unter bestimmten Extraktionsbedingungen (pH < 9, ohne Zugabe von SDS) sein N-terminales Ende (ca. 12 kDa) abgespalten wird (WALKER et al., 1997). Da WALKER und CHEN (2002) keine detaillierten

Angaben über die Extraktion der von ihnen in den Immunoblotversuchen eingesetzten Braunalgenextrakten machten, ist ein direkter Vergleich mit den in dieser Arbeit erlangten Erkenntnissen über die PEPCK aus *E. siliculosus* schwierig. Dennoch erhärten ihre Ergebnisse den hier abgeleiteten Schluss, dass das 18 kDa-Polypeptid als Abbauprodukt des 62 kDa-Polypeptids der PEPCK aus *E. siliculosus* anzusehen ist.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass trotz der Übereinstimmung grundlegender funktioneller Charakteristika die strukturellen Unterschiede der (ATP-) PEPCKs verschiedener Spezies von Algen und höheren Pflanzen zum Teil erheblich sein können. So ist das Ausbleiben immunchemischer Reaktionen bei Einsatz eines bestimmten Antikörpers darauf zurückzuführen, dass entweder das entsprechende Antigen in dem untersuchten Organismus nicht vorkommt, oder aber, dass grundlegende Divergenzen bezüglich der Epitope der untersuchten Proteine bestehen.

#### 4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Ausgehend von isolierter RNA aus *E. siliculosus* sollte mittels reverser Transkription und anschließender Amplifikation der cDNA durch 3'-RACE-PCR die für die PEPCK und das ME der Alge codierende DNA ermittelt werden. Aufgrund fehlender DNA-Sequenzinformationen - auch von anderen Braunalgen - mußten dabei degenerierte Primer eingesetzt werden, die von einem Aminosäuresequenzabschnitt des N-Terminus des 18 kDa- sowie des 62 kDa-Polypeptids der PEPCK aus *E. siliculosus* abgeleitet wurden (siehe 3.9). Trotz zahlreicher Variationen in der Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes sowie in der Annealing- und Elongations-Zeit und -Temperatur konnte nur mit dem GSP P62-Primer ein spezifisches ca. 1,1 kb großes Produkt amplifiziert werden. Dieses scheint jedoch aufgrund zu geringer Größe nicht für das 62 kDa-Polypeptid der PEPCK, sondern ein anderes Protein zu kodieren. Vergleiche in Datenbanken (3.10) lassen keine Rückschlüsse darauf zu, für welches Protein die isolierte DNA codieren könnte.

Als Grund für das Ausbleiben eines PEPCK-spezifischen Produkts in den PCRs sind verschiedene Ursachen denkbar. Generell besteht die Möglichkeit, dass die codierende RNA in den Zellen nur in sehr geringen Mengen vorliegt, und deshalb die Gefahr eines Verlustes im Verlauf der Extraktion sehr hoch ist. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Transkription der entsprechenden RNA einer tageszeitabhängigen Rhythmik unterliegt und sie nur zu bestimmten Tages- oder Nachtzeiten in der Zelle auftritt. Da die Aktivität sowohl der PEPCK als



auch des  $\text{NADP}^+$ -Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* ihr Aktivitätsmaximum in der Mittagszeit zeigten (BUSCH UND SCHMID, 2001), wurde die Extraktion der RNA stets kurz vor Mittag durchgeführt.

Um auszuschließen, dass RNA-Sekundärstrukturen während der Reversen Transkription mit MMLV-RT nicht vollständig aufgeschmolzen wurden - dies würde zu unvollständig synthetisierter cDNA führen und ein Binden des genspezifischen Primers in der anschließenden PCR verhindern -, wurde neben der reversen Transkription mit MMLV-RT auch eine Reverse Transkription in einem hier nicht näher erläuterten Versuchsansatz unter Einsatz von *Tth* DNA-Polymerase durchgeführt. Diese bietet im Gegensatz zur MMLV-RT die Möglichkeit, die Reverse Transkription bei 60°C (im Gegensatz zu 42°C mit der MMLV-RT) durchzuführen und somit auch hartnäckige Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen (INNIS, 1988). Doch auch unter Einsatz der so erhaltenen cDNA entstand in den anschließenden 3'-RACE-PCR-Reaktionen kein spezifisches Produkt.

Das Hauptproblem stellt hier sicher der Einsatz von degenerierten Primern dar. Hierdurch ließen sich nur Näherungswerte für die Annealingtemperatur in der PCR verwenden. Leider blieb auch bei der Wahl unterschiedlicher Annealing-Temperaturen (im Gradienten-Cycler) die Bildung eines spezifischen Produktes aus.

Als Alternative der dargelegten Methode zur Suche nach spezifischen Genen kommt das Erstellen und anschließende Screenen rekombinanter DNA-Banken in Frage. Diese Methode wurde aufgrund des in der Regel größeren Zeitaufwandes für die Durchführung nicht gewählt. Außerdem könnte auch hier der Einsatz degenerierter Sonden nicht vermieden werden.

## 4.5 Enzym-Lokalisation

Die Lokalisation der PEPCK in den Zellen von *E. siliculosus* erfolgte unter Einsatz des Antikörpers gegen das 18 kDa-Polypeptid der PEPCK dieser Alge. Dabei ergab sich eine intensive indirekte Immunfluoreszenz (ausschließlich) in den mit den Chloroplasten der Alge assoziierten Pyrenoiden (Abb. 3.24a). (Die intensivste Markierung ergab sich dann, wenn die Chloroplasten aufgebrochen vorlagen und die Antikörper direkt in die Matrix diffundieren konnten.) Dieses Ergebnis stimmt grundsätzlich mit den durch Immunogold-Lokalisationsstudien gewonnenen Daten für die Diatomee *Skeletonema castatum* überein. Die PEPCK dieser Mikroalge wurde ebenfalls in den Pyrenoiden, zusätzlich aber auch im Stroma entlang der Thylakoide des Chloroplasten lokalisiert (CABELLO-PASINI et al., 2001). Derselbe

Antikörper lokalisierte PEPCK außerdem in den Chloroplasten der pyrenoidlosen Alge *Laminaria setchellii* (CABELLO-PASINI et al., 2001). Auch REINFELDER et al. (2000) fanden nach subzellulärer Fraktionierung 75% der PEPCK-Aktivität der Diatomee *Thalassiosira weissflogii* mit den Chloroplasten assoziiert. In einem parallelen Versuchsansatz wurde auch für Rubisco als rein chloroplastidärem Enzym ein ähnlicher Wert ermittelt, woraufhin geschlossen wurde, dass möglicherweise die gesamte PEPCK im Chloroplasten vorliegt. JOHNSTON et al. (2001) vermuteten jedoch, dass diese Werte durch die beträchtlichen Kontaminationen in den Zellfraktionen zustandekamen.

Anders als in den angeführten Algen scheint das Vorkommen der PEPCK vaskulärer Pflanzen ausschließlich auf das Cytosol beschränkt (LEEGOOD und AP REES, 1978; KU et al., 1980). Zwar wurde in früheren Studien von der Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien berichtet (RATHNAM und EDWARDS, 1975), diese Annahmen erwiesen sich jedoch aufgrund von später diagnostizierten Problemen mit der angewendeten Zell-Fraktionierungstechnik als nicht zutreffend (KU, 1980).

Auch in der Grünalge *Udotea flabellum* wurden beträchtliche Mengen PEPCK nachgewiesen (1-3 Units PEPCK pro Gramm Frischgewicht; REISKIND et al., 1988). Aufgrund von Inhibitionsstudien mit 3-Mercaptopikolinsäure wurde vermutet, dass die PEPCK in dieser Alge sowohl als Carboxylase (Cytosol) als auch als Decarboxylase (im Chloroplasten) fungieren könnte (REISKIND und BOWES, 1991). In späteren immunhistochemischen Studien wurde das Enzym jedoch wie bei höheren Pflanzen ausschließlich im Cytosol nachgewiesen (REISKIND und BOWES, 1995). Ob es dabei von Bedeutung ist, dass der bei diesen Untersuchungen verwendete Antikörper (gegen PEPCK von *Urochloa panicoides*, von J. Burnell bereitgestellt) unter Einsatz cytosolischer PEPCK aus höheren Pflanzen erzeugt worden war, ist unklar. Derselbe Antikörper zeigte in der vorliegenden Arbeit keine spezifischen Kreuzreaktionen mit Rohextraktproteinen aus *E. siliculosus*. Aus den dargelegten Ergebnissen kann somit geschlossen werden, dass entweder unterschiedlich lokalisierte Isoenzyme der PEPCK in marinen Algen existieren oder aber dass sich das chlorophytische und das chromophytische Enzym strukturell grundlegend unterscheiden.

Weiterführende Immunfluoreszenz-Experimente ergaben, dass wie die PEPCK, auch die Rubisco von *E. siliculosus* in den mit den Plastiden assoziierten Pyrenoiden lokalisiert vorliegt. Im restlichen Chloroplasten ergab sich kein entsprechendes Rubisco-spezifisches Signal (siehe 3.4.2). Das gleiche Resultat zeigte sich bei der Braunalge *Pylaiella littoralis*, die ei- bis linsenförmige Chloroplasten mit ebenfalls gestielten Pyrenoiden besitzt. Diese Beobachtungen

deuten darauf hin, dass bei beiden Arten unter den gegebenen Kulturbedingungen neben der PEPCK auch zumindest der überwiegende Anteil der Rubisco im Pyrenoiden vorliegt.

Im Gegensatz zu *E. siliculosus* liegen für *Pylaiella littoralis* detaillierte Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der chlorophyllfreien Pyrenoide vor. Diese besagen, dass die Rubisco den Hauptanteil des pyrenoidalen Proteins stellt (KERBY und EVANS, 1978; 1981). Diese Eigenschaft erwies sich nicht als auf Phaeophyceen beschränkt, sondern konnte auch bei Vertretern anderer Algenstämme - beispielsweise zahlreicher Chlorophyceen wie *Eremosphaera*- und *Chlamydomonas*-Arten - nachgewiesen werden (KUCHITSU et al., 1991; OKADA, 1992). Für *Chlamydomonas* konnte außerdem gezeigt werden, dass Mutanten mit einer Deletion im Gen, welches für die große Untereinheit der Rubisco codiert, keine Pyrenoide ausbilden (RAWAT et al., 1996). In unabhängig voneinander durchgeführten Immunolokalisations-Studien schwankte der Anteil der Rubisco in den Pyrenoiden von *Chlamydomonas reinhardtii* zwischen 5 % (SÜSS et al., 1995) und 99 % (LACOSTE-ROYAL und GIBBS, 1987; MORITA et al., 1997). Erst spätere Untersuchungen zeigten, dass die CO<sub>2</sub>-Verhältnisse, unter denen die Algen angezogen wurden, entscheidend für den in den Pyrenoiden lokalisierten Anteil der Rubisco waren (BORKHSENIUS et al., 1998; MORONEY UND CHEN, 1998). So fand sich der überwiegende Anteil der Rubisco in den Pyrenoiden, wenn die Algen unter niedrig-CO<sub>2</sub>-Bedingungen angezogen worden waren. Auch für die hier untersuchten Zellen von *E. siliculosus* ist unter den gegebenen Kulturbedingungen von einer Anzucht unter niedrig-CO<sub>2</sub>-Verhältnissen auszugehen. Ob auch bei den filamentösen Phaeophyceen, wie *E. siliculosus* und *P. littoralis*, der Rubisco-Gehalt der Pyrenoide vom CO<sub>2</sub>-Angebot abhängt, bleibt zu überprüfen. Klarheit darüber würden Immunlokalisationsversuche mit unter seriell unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Bedingungen angezogenen Zellen verschaffen.

Untersuchungen mit *E. siliculosus* und *P. littoralis* zeigten im Rahmen dieser Arbeit, dass die Lichtintensität als ein entscheidender Faktor bezüglich der Expression sowohl der PEPCK als auch der Rubisco zu sehen ist. So waren nach dreiwöchiger Kultur unter Schwachlicht (0,15 Wm<sup>-2</sup>) die PEPCK in *E. siliculosus* und die Rubisco in *P. littoralis* nicht mehr detektierbar. Für die Rubisco von *E. siliculosus* zeigte sich eine deutliche Abschwächung der Immunfluoreszenz (verglichen mit unter "Normalbedingungen" (1,5 Wm<sup>-2</sup>) angezogenen Zellen). Zellen, die für weitere zwei Wochen unter Schwachlicht kultiviert worden waren, zeigten eine zusätzliche Abschwächung der Immunfluoreszenz. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die Rubisco der Grünalge *Dunaliella tertiolecta* gemacht (LIN und CARPENTER, 1997). Bei relativ hohen Lichtintensitäten (91 µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) zeigten hier 98% der Zellen Immunfluoreszenz der

Rubisco in distinkten Pyrenoiden, während unter niedrigen Lichtintensitäten ( $15 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) nur noch bei 70-80% der Zellen Pyrenoide nachgewiesen werden konnten. Zwar wurde vermutet, dass die Rubisco bei im Schwachlicht angezogenen Zellen im übrigen Chloroplasten verteilt vorliegt, dies wurde jedoch nicht dokumentiert. Unabhängig davon wurde der Nachweis einer solchen lichtintensitätsabhängigen Verteilung der Rubisco zwischen Pyrenoid und Chloroplastenstroma für den Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* erbracht (JENKS und GIBBS, 2000). Während unter moderaten Lichtintensitäten von  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  über 70% der Rubisco im Pyrenoiden lokalisiert vorliegt, konnte bei unter Schwachlicht ( $20 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) angezogenen Zellen nur 37 % der gesamten chloroplastidären Rubisco im Pyrenoiden nachgewiesen werden. Die restlichen 63 % verteilten sich auf die Thylakoidregionen des Chloroplasten.

Eine vergleichbare Veränderung im Verteilungsmuster der Rubisco scheint für *E. siliculosus* unter den hier gewählten Bedingungen nicht vorzuliegen. Vielmehr sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine verminderte Expression des Enzyms im Schwachlicht. Es scheint außerdem sehr unwahrscheinlich, dass aufgrund unterschiedlichen Eindringens des Antikörpers der Nachweis des Enzyms im Pyrenoiden, nicht aber im Chloroplasten gelingt (dies gilt auch für den Nachweis der PEPCK). Zum einen nicht, weil Pyrenoid wie Chloroplast vom gleichen Satz an Chloroplastenmembranen umgeben sind (EVANS, 1966). Zum anderen konnte auch in aufgebrochenen Chloroplasten, in denen das Stroma frei zugänglich vorlag, keine Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob bei *E. siliculosus* eine Verlagerung der Rubisco innerhalb kürzerer Zeitspannen (< drei Wochen) oder auch als Folge einer tageszeitabhängigen Rhythmik auftritt. Beispielsweise konnten OSAFUNE et al., (1990) für synchronisierte *Euglena gracilis*-Kulturen mittels Immunogold-Markierung zeigen, dass während der Dunkelphase die Pyrenoide verschwinden und die Rubisco über den gesamten restlichen Chloroplasten verteilt ist, während in der Lichtphase eine Neubildung Rubisco-gefüllter Pyrenoide stattfindet. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden auch für *C. reinhardtii* gemacht (OSAFUNE et al., 1997).

Generell ist aufgrund der Koloalisation von PEPCK und Rubisco in den Pyrenoiden von *E. siliculosus* der von SCHMID und DRING (1996a; b) postulierte  $\text{C}_4$ -Weg für diese Alge auszuschließen.

## 4.6 Ist der Pyrenoid ein Teil des CCM ?

Wie bei der Grünalge *Dunaliella tertiolecta* und dem Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* (siehe oben) konnte auch für *E. siliculosus* eine lichtabhängige Änderung der Rubisco-Konzentration in den Pyrenoiden nachgewiesen werden. Für *A. carterae* wurde diese Eigenschaft als Teil eines für diesen Dinoflagellaten postulierten CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus (CCM) interpretiert (JENKS und GIBBS, 2000).

Seit einiger Zeit werden Pyrenoide hinsichtlich einer möglichen Funktion in einem CCM (kontrovers) diskutiert (BADGER et al., 1998; MORONEY und SAMANCHI, 1999; THOMS et al., 2001). Auslösend dafür war die Identifizierung von Carboxysomen als zentralem Kompartiment cyanobakterieller CCMs (BADGER und PRICE, 1992; PRICE et al., 1998; KAPLAN et al., 1998). Analog zur Lokalisation der Rubisco in den Pyrenoiden zahlreicher eukaryotischer Algen ist nämlich in Cyanobakterien die Rubisco als zentrales Enzym des CCM in den Carboxysomen lokalisiert (MCKAY und GIBBS, 1991). Selbst für Lebermoose (Anthocerotophyta) wurde eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten Rubisco-gefüllter Pyrenoide und einer gleichzeitigen CCM-Aktivität nachgewiesen (HANSON et al., 2002). Die Existenz von CCMs in aquatischen Systemen und ihr Beitrag zur Photosynthese war bereits Thema zahlreicher Untersuchungen (BADGER et al., 1998; KAPLAN und REINHOLD, 1999). Jedoch liegt der Schwerpunkt dieser Arbeiten auf Cyanobakterien und einigen wenigen im Süßwasser lebenden "grünen" Mikroalgen (SPALDING, 1998; BADGER und SPALDING, 2000; BADGER et al., 2002). Für sie konnte gezeigt werden, dass die Induktion eines CCM im Allgemeinen durch geringe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ausgelöst wird, wie sie beispielsweise auch im Oberflächenwasser mariner Systeme auftreten. Hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im umgebenden Medium ( $\geq 1\%$  CO<sub>2</sub> in der Gasphase) führten dagegen in der Regel zur Unterdrückung des CCM (SPALDING und PORTIS, 1985; BEARDALL et al., 1998). Wie anhand von *Synechococcus*-Mutanten gezeigt werden konnte, kann aber auch eine Fehllokalisation der Rubisco in Zellen zu einem nur sehr schwach ausgebildeten CCM führen (ORÚS et al., 1995; SCHWARZ et al., 1995). Das Gen, über welches die Kontrolle der Induktion eines CCM in *Chlamydomonas reinhardtii* bei entsprechender CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit erfolgt, wurde kürzlich von FUKUZAWA et al. (2001) charakterisiert. Die meisten Spezies eukaryotischer Algen, für die bislang ein CCM nachgewiesen werden konnte, verfügen über Pyrenoide (BADGER et al., 1998). Demgegenüber existieren frei-lebende Arten von *Chloromonas*, die zwar klare Anzeichen eines CCM zeigen, jedoch keine Pyrenoide besitzen (MORITA et al., 1998; 1999).

Wie THOMS et al. (2001) anhand eines Rechen-Modells darlegten, sind Pyrenoide nicht obligat für das Betreiben eines CCM. Es wurde gezeigt, dass - wie im Fall der Chloromonadophyceen und Chrysophyceen - das Vorliegen einer Gürtellamelle sowie von vier den Chloroplasten umgebende Membranen ausreichend für die Funktionsfähigkeit eines CCM sind. Jedoch stellten sie auch heraus, dass Pyrenoide allgemein die Effektivität eines CCM stark erhöhen können.

Für *E. siliculosus* ist bekannt, dass die Zellen im Rotlicht intern  $C_i$  akkumulieren (HILLRICHS und SCHMID, 2001; SCHMID und HILLRICHS, 2001). Man weiß außerdem, dass die  $CO_2$ -Akquisition in dieser Alge unter der Beteiligung externer und interner Carboanhydrasen (SCHMID und DRING, 1996a) sowie direkter Hydrogencarbonat-Aufnahme erfolgt (SCHMID, 1998). Demgegenüber ist unklar, welche Komponenten dieses CCMs an der blaulichtinduzierten Freisetzung von  $CO_2$  aus dem Pool beteiligt sind. Es sind zwei Fälle einzelliger Algen bekannt, in denen Komponenten des CCM unter der Kontrolle von Blaulicht stehen. Für *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine extrazelluläre Carboanhydrase nachgewiesen, die einer spezifischen Blaulicht-Aktivierung unterliegt (DIONISIO et al., 1989). Ferner konnte für die Grünalge *Monoraphidium braunii* eine entsprechende Blaulicht-aktivierte Hydrogencarbonat-Pumpe nachgewiesen werden (GIRÁLDEZ et al., 1998).

Für *E. siliculosus* wurde aufgrund von Inhibitionsstudien mit Acetazolamid (als nicht Membran-permeablem Carboanhydrase-Inhibitor) und Ethoxyzolamid (als Membran-permeablem Carboanhydrase-Inhibitor; MORONEY et al., 1985) eine Blaulicht-Abhängigkeit sowohl der extrazellulären als auch der intrazellulären Carboanhydrase ausgeschlossen (SCHMID, 1998; SCHMID und HILLRICHS, 2001).

Auf der Basis dieser Befunde wurde über die Beteiligung einer Blaulicht-regulierten intrazellulären Protonenpumpe am  $C_i$ -Akquisitionsmechanismus der Alge spekuliert. Die Beteiligung einer solchen Pumpe würde unter anderem erklären, warum DCMU - als Inhibitor photosynthetischen Elektronentransports - eine Akkumulation von  $C_i$  im Rotlicht unterbindet (SCHMID und HILLRICHS, 2001).

SCHMID und HILLRICHS (2001) schlugen für *E. siliculosus* einen Mechanismus der  $C_i$ -Acquisition vor, mit dem durch die Aktivität einer entsprechenden Protonenpumpe eine pH-Wert-Erniedrigung innerhalb eines spezifischen intrazellulären Kompartiments - beispielsweise der Vakuole - erzeugt werden sollte. Sie postulierten, dass dieser Absenkung des pH-Wertes eine Verschiebung des  $HCO_3^-/CO_2$ -Gleichgewichtes in Richtung von  $CO_2$  folgen würde.  $CO_2$  sollte daraufhin mit dem Konzentrationsgradienten aus der Vakuole zum Ort der Photosynthese diffundieren, wo es für Metabolisierungsprozesse bereitstünde.

Abweichend von dieser Vorstellung wurden in dieser Arbeit jedoch nicht die Vakuole, sondern die Pyrenoide von *E. siliculosus* als saure Zellkompartimente identifiziert (siehe 3.6). Überträgt man jedoch den von HILLRICHS und SCHMID (2001) postulierten Mechanismus der blaulichtabhängigen Protonenpumpe auf die Pyrenoide, ließe sich ihre Beteiligung an der  $C_i$ -Akquisition der Alge wie folgt erklären: Wie oben dargelegt ist davon auszugehen, dass eine pH-Wert-Erniedrigung in den Pyrenoiden durch Blaulicht zu einer Verschiebung des  $HCO_3^-/CO_2$ -Gleichgewichts in Richtung von  $CO_2$  führt.  $CO_2$  läge dadurch in höheren Konzentrationen als im Außenmedium vor und stünde sowohl der in den Pyrenoiden lokalisierten Rubisco als auch der PEPC als Substrat direkt zur Verfügung. Durch die Verschiebung des  $CO_2/HCO_3^-$ -Gleichgewichtes kommt es zu einem lokalen Absinken der  $HCO_3^-$ -Konzentration in den Pyrenoiden, die durch Diffusion aus dem Stroma der Plastiden und dem Cytosol wieder ausgeglichen werden muß. Es entsteht damit ein auf die Pyrenoide gerichteter  $HCO_3^-$ -„Sog“, der zumindest einen treibenden Teil des  $CO_2$ -Akquisitionsmechanismus darstellen könnte. Ein mit den Pyrenoiden gekoppelter Mechanismus der  $C_i$ -Akquisition macht Sinn, insbesondere auch deshalb, weil die Rubisco ausschließlich hier lokalisiert ist.

Ob tatsächlich eine an der Pyrenoidmembran lokalisierte Protonenpumpe, die zudem einer Blaulicht-Regulation unterliegen soll, an der Bildung eines solchen CCMs beteiligt ist, bleibt nachzuweisen. Dazu könnten beispielsweise Versuche unter Einsatz spezifischer Ionophoren, die die Aktivität von Protonenpumpen unterbinden, durchgeführt werden. Dabei wäre zu erwarten, dass eine Inhibierung dieser Pumpen eine Erhöhung des pH-Wertes bewirken und damit den blaulichtabhängigen Teil der  $CO_2$ -Akquisition blockieren würde. Die nachgewiesene CDFFDA-spezifische Fluoreszenz innerhalb der Pyrenoide müßte demnach abgeschwächt auftreten oder aber völlig wegfallen. Ferner könnten Rotlichtexperimente klären, ob die Protonenpumpe einer Blaulichtkontrolle unterliegt. Geht man davon aus, dass die Protonenpumpe durch Blaulicht aktiviert wird und ausschließlich eine Ansäuerung innerhalb der Pyrenoide verursacht, sollte diese Ansäuerung im Rotlicht fehlen. In einem entsprechenden Versuchsansatz dürften demnach im Rotlicht angezogene Zellen von *E. siliculosus* erst nach Gabe von BL-Pulsen eine Ansäuerung in den Pyrenoiden zeigen. Der Einsatz der bisher verwendeten Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure ist für dieses Experiment jedoch ungeeignet, weil dieser Fluoreszenzfarbstoff mit Blaulicht (bei 488nm) angeregt werden muss und so eine Untersuchung unter reinen Rotlichtbedingungen unmöglich macht. Ein entsprechender Fluoreszenz-Farbstoff, der für die Lokalisation acider Zellkompartimente geeignet wäre und durch längerwelliges Licht ( $\geq 520$  nm) angeregt wird, ist derzeit nicht käuflich zu erwerben. Desweiteren erwies sich der Einsatz von Neutralrot als Indikator saurer Zellbereiche für die Zellen von *E. siliculosus* als ungeeignet, da

Neutralrot unspezifisch in der gesamten Zelle akkumuliert (ohne Abbildung). Diese zellübergreifende Markierung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Neutralrot sich über Wasserstoffbrückenbindungen an die in der Alge in großen Mengen auftretenden polyphenolischen Verbindungen anlagert (siehe dazu auch GROLIG und WAGNER, 1987).

#### 4.7 Die Rolle der PEPCK in *E. siliculosus*

Die Zahl der Studien zur Lokalisation der PEPCK in Algen ist gering. Dadurch ist die Möglichkeit eines Vergleichs der Rolle der PEPCK in *E. siliculosus* mit der in anderen Algen sehr beschränkt. In *E. siliculosus* findet sich das Enzym - wie in der Kieselalge *S. costatum* (CABELLO-PASINI et al., 2001) - in den Pyrenoiden. Für beide Arten, wie auch für *Laminaria setchellii*, bei der die PEPCK im Stroma der pyrenoidlosen Chloroplasten detektiert wurde, wird klar, dass PEPCK und Rubisco direkt nebeneinander lokalisiert sind. Unter der Voraussetzung, dass beide Enzyme in aktiver Form vorliegen, muss man demnach davon ausgehen, dass sie um CO<sub>2</sub> als Substrat ihrer Carboxylierungsreaktion konkurrieren. Dass die Rubisco in den Pyrenoiden katalytisch aktiv vorliegt, wurde zum einen aus der co-Lokalisation von Rubisco und Rubisco-Aktivase in den Pyrenoiden von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Coleochaete scutata* sowie zahlreicher Lebermoose geschlossen (MCKAY et al., 1991; MCKAY und GIBBS, 1991). Zum anderen erschien die Rubisco (ähnlich wie bei *E. siliculosus*) in photosynthetisch aktiven Zellen von *Chlorella pyrenoidosa* und *Euglena gracilis* ausschließlich auf die Pyrenoide beschränkt zu sein (MCKAY und GIBBS, 1989; OSAFUNE et al., 1990).

Zwar ist zu vermuten, dass auch die PEPCK von *E. siliculosus* in den Pyrenoiden in aktiver Form vorliegt, jedoch ist eine Feinregulierung unter bestimmten Bedingungen in der Zelle nicht auszuschließen. Beispielsweise wäre eine Regulation der Aktivität beider Enzyme über Veränderungen der pH-Bedingungen im Pyrenoiden denkbar. Während das pH-Optimum der PEPCK mariner Braunalgen um pH 7.0 schwankt (siehe Tabelle 4.1), erreicht die Rubisco ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert  $\geq 8$  (JENSEN und BAHR, 1977, JOHNSTON, 1991). Der pH-Wert des Stromas der Chloroplasten schwankt zwischen 7.2 in Dunkelheit und 8.0 während der Photosynthese (WERDAN et al., 1975; FLÜGGE et al., 1980). Deshalb postulierten CABELLO-PASINI et al. (2001) für *Laminaria setchellii*, dass die Rubisco in den Chloroplasten ihre größte Aktivität während des Tages zeigt, während die der PEPCK auf die Nacht beschränkt bliebe. Tatsächlich konnte auch für die Rubisco aus Braunalgen eine circadiane Rhythmik mit dem Maximum während der Mittagsstunden nachgewiesen werden (KREMER, 1981a).



Für *E. siliculosus* scheint eine solche tageszeitabhängige Verschiebung der Aktivitätsmaxima von Rubisco und PEPCK jedoch nicht vorzuliegen, denn hier zeigt die circadiane Aktivität der PEPCK ihr Maximum ebenfalls um die Mittagszeit (BUSCH und SCHMID, 2001). Messungen zur circadianen Rhythmik der Aktivität von Rubisco liegen für *Ectocarpus* allerdings nicht vor; die Photosynthese zeigt aber deutlich tagesrhythmische Aktivitätsmaxima ebenfalls um die Mittagszeit (SCHMID und DRING, 1992) und damit zeitgleich mit den Maxima der nicht an der Photosynthese beteiligten PEPCK.

Zudem wurden die Pyrenoide der Alge unter Einsatz von CDFFDA als saure Kompartimente identifiziert (zumindest während der Lichtphase; siehe 3.6). Bei diesen Lokalisationsexperimenten ergaben sich innerhalb der Pyrenoide jedoch stark unterschiedlich fluoreszierende Regionen, die auf einen uneinheitlichen pH-Wert des Stromas im Pyrenoiden schießen lassen. Darüber, ob solche pH-Unterschiede mit der Aktivität von PEPCK und Rubisco in Verbindung stehen, oder ob sie struktureller Natur sind, kann zur Zeit nur spekuliert werden.

Während sich die Frage zur Funktion des Malat-Enzyms in Braunalgen derzeit als völlig ungeklärt darstellt, existieren hier zumindest einige Erklärungsansätze zur Rolle der PEPCK. Eine Beteiligung beider Enzyme an einem biochemischen pH-Stabilisierungsmechanismus (im Cytosol) ist generell denkbar (DAVIES, 1986), erscheint jedoch im Hinblick auf die Lokalisation der PEPCK im Pyrenoid eher unwahrscheinlich. Außerdem würde ein solcher Regulationsmechanismus voraussetzen, dass das pH-Optimum des Malat-Enzyms aus *E. siliculosus* mehr im sauren pH-Bereich liegt (SAKANO, 1998, siehe oben).

Für Braunalgen konnten außer der Aktivität der PEPCK keine (oder nur sehr geringe) Aktivitäten weiterer  $\beta$ -Carboxylasen wie PEPC, PEP-Carbotransphosphorylase und Pyruvat-Carboxylase nachgewiesen werden (AKAGAWA et al., 1972; KREMER und KÜPPERS, 1977; KERBY und EVANS, 1983b; KREMER, 1981a als Übersichtsartikel). Dies führte zu der weit verbreiteten Annahme, dass ausschließlich die PEPCK für die lichtunabhängige  $\text{CO}_2$ -Fixierung in Phaeophyceen verantwortlich ist, zumal Muster lichtunabhängiger  $\text{CO}_2$ -Fixierung signifikant mit der PEPCK-Aktivität in einigen Laminarien korrelieren (KÜPPERS und KREMER, 1978; CABELLO-PASINI und ALBERTE, 2001). Für die lichtunabhängige  $\text{CO}_2$ -Fixierung im Meristem von *Laminaria hyperborea* konnte sogar ein Anteil von bis zu 85 % der Photosyntheserate nachgewiesen werden (KREMER, 1981b). Desweiteren wurde für *Laminaria hyperborea* und *Laminaria digitata* eine direkte Beteiligung der lichtunabhängigen  $\text{CO}_2$ -Fixierung an der Mobilisierung von Mannitol (dem Speichermetabolit der Braunalgen) im Dunkeln gezeigt (KREMER, 1981a; 1984). Diese ist in den späten Wintermonaten besonders stark. Dass die

lichtunabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung jedoch nicht auf die Dunkelheit beschränkt ist, konnte u. a. für *Ascophyllum nodosum* gezeigt werden, wo eine höhere  $\beta$ -Carboxylierung im Licht nachgewiesen wurde (JOHNSTON UND RAVEN, 1998).

Nachdem für *E. siliculosus* eine circadiane Rhythmik der PEPCK-Aktivität mit dem Maximum um die Mittagszeit nachgewiesen wurde (BUSCH UND SCHMID, 2001), erscheint eine dem Enzym in Laminarien vergleichbare Funktion eher unwahrscheinlich. Zudem unterliegt die Mobilisierung von Mannitol in Seetangen einem jahreszeitlichen Rhythmus mit einem Aktivitätspeak im Frühjahr. Unter anderem aufgrund der geringen Speicherkapazität der Zellfäden von *Ectocarpus* scheint es zweifelhaft, dass eine vergleichbare saisonabhängige Mobilisierung von Speichermetaboliten auch für diese Art relevant sein könnte.

Überdies konnte in einer späteren Untersuchung von CABELLO-PASINI und ALBERTE (2001) in verschiedenen Braunalgen, darunter auch *Laminaria setchellii*, eine ausgeprägte Kopplung zwischen Photosyntheserate und lichtunabhängiger CO<sub>2</sub>-Fixierung nachgewiesen werden. Deshalb wurde vermutet, dass die lichtunabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung weniger von Speichermetaboliten, als vielmehr von 3-Phosphoglycerinsäure aus dem Calvin-Zyklus gespeist wird. Außerdem wurde aus den geringen Verhältnissen der lichtunabhängigen CO<sub>2</sub>-Fixierung zur maximalen Photosyntheserate geschlossen, dass es wahrscheinlicher ist, dass die lichtunabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung eher der Synthese von organischen Säuren sowie Aminosäuren dient ( $\Rightarrow$ anaplerotische Funktion), als dass sie zum Abbau von Speichermetaboliten beiträgt.

Wie oben diskutiert scheinen auch bei *E. siliculosus* lichtunabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung und Photosynthese zeitgleich abzulaufen. Eine Beteiligung der PEPCK an Vorgängen, die zum Auffüllen des Citrat-Zyklus dienen, ist daher auch hier denkbar. Dies setzt jedoch voraus, dass sich die Aktivitäten von PEPCK und Rubisco nicht gegenseitig behindern.

Die PEPCK in Braunalgen teilt einige entscheidende Charakteristika mit dem Enzym aus höheren Pflanzen und Grünalgen (insbesondere ADP / ATP- und Mn<sup>2+</sup>-Abhängigkeit, pH-Optimum, 3-Mercaptopikolinsäure-Inhibierung). Dennoch deuten grundlegende Unterschiede wie die intrazelluläre Lokalisation sowie die molekulare Masse des nativen Proteins darauf hin, dass die Enzyme Produkte einer divergenten Entwicklung sind, ausgehend von einem gemeinsamen evolutionären Ursprung.

## 5 Zusammenfassung

In der filamentösen Braunalge *Ectocarpus siliculosus* liegen die Enzyme PEPCK und das NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzym mit hohen Aktivitäten vor. Eine Beteiligung beider Enzyme an einem für die Alge vorgeschlagenen C<sub>4</sub>/CAM-Metabolismus wurde fraglich, nachdem zum einen nicht alle der für einen vollständigen Zyklus benötigten Enzyme nachgewiesen werden konnten und zum anderen die beteiligten Metaboliten *in vivo* in zu geringen Konzentrationen vorlagen, um für den postulierten Speichermetaboliten von CO<sub>2</sub> in Frage zu kommen. Von diesen Schlussfolgerungen ausgehend stellte sich verstärkt die Frage nach der Funktion der mit solch hohen Aktivitäten in der Alge auftretenden Enzyme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die decarboxylierende NADP<sup>+</sup>-Malatdehydrogenase (Malat-Enzym; NADP<sup>+</sup>-ME) aus der filamentösen Braunalge *Ectocarpus siliculosus* gereinigt. Die native PEPCK hatte unter den gewählten Bedingungen eine relative molekulare Masse von 90 kDa. Nach Denaturierung in der SDS-PAGE zeigte sich ein 62 kDa- sowie ein prominenteres 18 kDa-Polypeptid (gelegentlich trat zusätzlich ein 30 kDa-Polypeptid auf). Für das native NADP<sup>+</sup>-ME wurde eine relative molekulare Masse von 440 kDa bestimmt. In der SDS-PAGE zeigte sich ein einzelnes 56 kDa-Polypeptid, und es wurde geschlossen, daß das Enzym als Oktamer in den Zellen vorliegt.

Für die PEPCK wurden die Substratabhängigkeiten in Richtung der Carboxylierungsreaktion bestimmt. Dabei ergaben sich für CO<sub>2</sub>, PEP und ADP normale Michaelis-Menten-Kinetiken mit den K<sub>m</sub>-Werten 1,46 mM (CO<sub>2</sub>), 0,5 mM (PEP) und 0,23 mM (ADP). Auch für die Decarboxylierungsreaktion des MEs zeigte sich mit Malat eine normale Michaelis-Menten-Kinetik (K<sub>m</sub> 0,36 mM). Im Falle des NADP<sup>+</sup> wurde das Vorliegen positiver Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von 2,74 nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, daß das Enzym über mindestens drei Bindungsstellen für NADP<sup>+</sup> verfügt.

Die Polypeptide der PEPCK wurden nach der SDS-PAGE ansequenziert und von den Sequenzen degenerierte Primer abgeleitet. Von Poly-A<sup>+</sup>-RNA bzw. Gesamt-RNA wurden jeweils cDNA hergestellt und die Primer für die 3'-RACE-PCR verwendet. Dabei entstand nur mit dem Primer für das 62 kDa-Polypeptid ein spezifisches Produkt. Dieses ist jedoch zu kurz und es handelt sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um PEPCK. Seine Sequenz zeigt keine Homologien zu bekannten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinasen.

Das gereinigte ME war N-terminal blockiert und entzog sich dem Ansequenzieren. Ein Primer, der aus Konsensussequenzen von NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzymen höherer Pflanzen abgeleitet wurde, ergab in der 3'-RACE-PCR kein spezifisches Produkt.

Antikörper gegen PEPCK bzw. ME von höheren Pflanzen reagierten in Immunoblotversuchen nicht mit den spezifischen Polypeptiden aus *E. siliculosus*. Deshalb wurden spezifische Antikörper gegen die denaturierten Polypeptide der Alge hergestellt. Nach der Immunisierung von Kaninchen ergab sich nur gegen das 18 kDa Polypeptid der PEPCK ein brauchbarer Antikörper. Dieser reagierte sowohl mit dem 18 kDa, als auch mit dem 62 kDa-Polypeptid der PEPCK.

In Immunolokalisationsstudien mit diesem Antikörper wurde die PEPCK in den Pyrenoiden der Alge nachgewiesen. Parallel dazu wurde auch die Rubisco (mit einem Antikörper gegen das Enzym aus Spinat) in den Pyrenoiden lokalisiert. Bei Lokalisationsversuchen mit beiden Antikörpern in *Pylaiella littoralis* konnte nur Rubisco nachgewiesen werden, hier ebenfalls in den Pyrenoiden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Färbung mit Oregon Green<sup>®</sup> 488 Carbonsäure konnten die Pyrenoide von *E. siliculosus* als saure Kompartimente identifiziert werden. Diese Eigenschaft dürfte, im Zusammenhang mit der strengen Lokalisation der Rubisco in den Pyrenoiden der Zellen, eine zentrale Rolle im C<sub>i</sub>-Akquisitionsmechanismus von *E. siliculosus* spielen. Die Lokalisation der PEPCK in direkter Nachbarschaft zur Rubisco deutet auf eine anaplerotische Rolle in den Zellen der Alge hin.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akagawa, H., Ikawa, T. und Nisiziwa, K. (1972). The enzyme system for the entrance of  $^{14}\text{CO}_2$  in the dark fixation of brown algae. *Plant and Cell Physiology* **13**: 999-1016
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped-Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402
- Andría, J. R., Pérez-Lloréns, J. L. und Vergara, J. J. (1999). Mechanism of inorganic carbon acquisition in *Gracilaria gaditana* nom. Prov. (Rhodophyta). *Planta* **208**: 564-573
- Asami, S., Inoue, K., Matsumoto, K., Murachi, A. und Akazawa, T. (1979). NADP-malic enzyme from maize leaf: Purification and Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **194**: 503-510
- Avilan, L. und Garcia, P. (1994). Hysteresis of cytosolic NADP-malic enzyme II from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 225-232
- Axelsson, L., Mercado, J. M. und Figueroa, F. L. (2000). Utilization of  $\text{HCO}_3^-$  at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. *European Journal of Phycology* **35**: 53-59
- Badger, M. R. (1987). The  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanism in aquatic phototrophs. In: 'The Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise' (Hatch, M. D. und Boardman, N. R.), **10**: 219-274
- Badger, M. R. und Price, G. D. (1992). The  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiologia Plantarum* **84**: 606-615
- Badger, M. R. und Spalding, M. H. (2000).  $\text{CO}_2$  acquisition, concentration and fixation in cyanobacteria and algae. In: 'Photosynthesis: Physiology and Metabolism' (Leegood, R. C., Sharkey, T. D. und von Caemmerer, S.): 369-397. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Badger, M. R., Hanson, D. und Price, G. D. (2002). Evolution and diversity of  $\text{CO}_2$  concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology* **29**: 161-173
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowless, D. C., Leggat, W. und Price, G. D. (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanism in algae. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1043-1051
- Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **91**: 2216-2220
- Bartolucci, S., Rella, R., Guagliardi, A., Raia, C., Gambacorta, A., DeRosa, M. und Rossi, M. (1987). Malic enzyme from archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 7725-7731
- Baur, B., Dietz, K.-J. und Winter, K. (1992). Regulatory protein phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative crassulacean acid-metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.. *European Journal of Biochemistry* **209**: 95-101
- Beardall, J. und Roberts, S. (1999). Inorganic carbon acquisition by two antarctic macroalgae, *Porphyra endivifolia* (Rhodophyta: Bangiales) and *Palmaria decipiens* (Rhodophyta: Palmariales). *Polar Biology* **21**: 310-315
- Beardall, J., Johnston, A. und Raven, J. A. (1998). Environmental regulation of  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanisms in microalgae. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1010-1017

- Berkoff, C. F., Di Tullio, N. W. und Weisbach, J. A. (1975). Methods and pharmaceutical composition for inhibiting gluconeogenesis. United States Patent 3,860,716
- Bers, G. und Garfin, D. (1985). Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *BioTechniques* **3**: 276-288
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **100**: 243-255 Teil B
- Bjerrum, O. J. und Schafer-Nielsen, C. (1986). Buffer system and transfer parameters for semidry electroblotting with horizontal apparatus In: 'Electrophoresis '86' (Dunn, M. J): 315-327. VCH, Weinheim
- Björk, M., Haglund, K., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G. und Pedersen, M. (1992). Inorganic carbon assimilation in the green seaweed *Ulva rigida* C.Ag. (Chlorophyta). *Planta* **187**: 152-156
- Black, C. C., Chen, J.-Q., Doong, R. L., Angelov, M. N. und Sung, S. J. S. (1996). Alternative carbohydrate reserves used in the daily cycle of crassulacean acid metabolism. In: 'Crassulacean Acid Metabolism' (K. Winter und J. A. C. Smith): 47-73. Springer, Berlin
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**: 175-179
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Borkhsenius, O. N., Mason, C. B. und Moroney, J. V. (1998). The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **116**: 1585-1591
- Borland, A., Técsi, L., Walker, R. P. und Leegood, R. C. (1998). Inducibility of Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia*; physiological/biochemical characterisation and intercellular localisation of carboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta* **201**: 368-378
- Bowes, G. (1987). Aquatic photosynthesis: strategies that enhance carbon gain . In: 'Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats' (R. M. M. Crawford): 79-98. Blackwell Publications, Oxford
- Brasier, M. D., Green, O. R., Jephcoat, A. P., Kleppe, A. K., van Kranendonk, M. J., Lindsay, J. F., Steele, A. und Grassineau, N. V. (2002). Questioning the evidence for earth's earliest fossils. *Nature* **416**: 76-81
- Bukato, G., Kochan, Z. und Swierczynski, J. (1995). Purification and properties of cytosolic and mitochondrial malic enzyme isolated from human brain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **27**: 47-54
- Burnell, J. N. (1986). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C<sub>4</sub> plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 577-587
- Busch, S. (1998). Enzymatik der blaulichtabhängigen, nicht-photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung von *Ectocarpus siliculosus*. Diplomarbeit, erstellt am Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

- Busch, S. und Schmid, R. (2001). Enzymes associated with  $\beta$ -carboxylation in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae): Are they involved in net carbon acquisition? *European Journal of Phycology* **36**: 61-70
- Cabello-Pasini, A. und Alberte, R. S. (2001). Expression of carboxylating enzymes in *Laminaria setchellii* (Phaeophyceae). *Phycologia* **40**: 351-358
- Cabello-Pasini, A., Smith, G. J. und Alberte, R. S. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the marine diatom *Skeletonema costatum* and the Phaeophyte *Laminaria setchellii*. I. Isolation and biochemical characterisation. *Botanica Marina* **43**: 559-568
- Cabello-Pasini, A., Swift, H., Smith, G. J. und Alberte, R. S. (2001). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the diatom *Skeletonema costatum* and the phaeophyte *Laminaria setchellii*. II. Immunological characterization and subcellular localization. *Botanica Marina* **44**: 199-207
- Casati, P., Andreo, C. S. und Edwards, G. E. (1999). Characterization of NADP-malic enzyme from species of Chenopodiaceae: *Haloxylon persicum* (C<sub>4</sub>) and *Chenopodium album* (C<sub>3</sub>). *Phytochemistry* **52**: 985-992
- Casati, P., Lara, V. und Andreo, C. S. (2000). Induction of a C<sub>4</sub>-like mechanism of CO<sub>2</sub> fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. *Plant Physiology* **123**: 1611-1621
- Casati, P., Spampinato, C. P. und Andreo, C. S. (1997). Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant and Cell Physiology* **38**: 928-934
- Casati, P., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Donahue, R. und Edwards, G. (1998). UV-B, red and far-red light regulate induction of the C<sub>4</sub> isoform of NADP-malic enzyme in etiolated maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 701-708
- Catling, D., Zahnle, K. J. und McKay, C.P. (2001). Biogenic methane, hydrogen escape and their irreversible oxidation of early earth. *Science* **293**: 839-843
- Chang, J.-T. und Chang, G.-G. (1982). Purification of pigeon liver malic enzyme by affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **121**: 366-369
- Chen, F., Okabe, Y., Osano, K. und Tajima, S. (1997). Purification and characterization of the NADP-malic enzyme from *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**: 384-386
- Chen, Z.-H., Walker, R. P., Acheson, R. M. und Leegood, R. C. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase assayed at physiological concentrations of metal ions has a high affinity for CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* **128**: 160-164
- Chen, Z.-H., Walker, R. P., Técsi, L., Wingler, A. und Leegood, R. C. (2000). Does phosphoenolpyruvate carboxykinase catalyse a gluconeogenic flux during the senescence of barley leaves or cucumber cotyledones? *Plant Cell Physiology* **41**: 960-967
- Chenchik, A., Moqadam, F. und Siebert, P. (1996). A new method for full-length cDNA cloning by PCR. In: 'A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis', (Krieg, P. A.): 273-321. Wiley-Liss, Inc.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. und Siebert, P. (1998). Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: 'RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis' (Siebert, P und Larrick, J.): 305-319. BioTechniques Books, MA

- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue sample. *BioTechniques* **15**: 532-535
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159
- Christopher, J. T. und Holtum, J. A. M. (1996). Patterns of carbon partitioning in leaves of crassulacean acid metabolism species during acidification. *Plant Physiology* **112**: 393-399
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalized by procariotic and eucariotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **19**: 9677-9686
- Colman, B. (1984). The effect of temperature and oxygen on the CO<sub>2</sub> compensation point of the marine alga *Ulva lactuca*. *Plant, Cell and Environment* **7**: 619-621
- Colman, B. (1991). Second international symposium on inorganic carbon utilization by aquatic photosynthetic organisms. *Canadian Journal of Botany* **69**: 907-1027
- Colman, B. und Roratore, C. (1995). Photosynthetic inorganic carbon uptake and accumulation in two marine diatoms. *Plant, Cell and Environment* **18**: 919-924
- Colombo, S. L., Andreo, C. S. und Podestá, F. E. (1997). Carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons: purification, characterization and developmental profile of NADP-dependent malic enzyme. *Physiologia Plantarum* **101**: 821-826
- Costa, G. L. und Weiner, M. P. (1994). Increased cloning efficiency with the PCR Polishing Kit. *Strategies* **7** (2): 48
- Cushman, J. C. (1992). Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Journal of Biochemistry* **208**: 259-266
- Cushman, J. C. und Bohnert, H. J. (1997). Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology* **113**: 667-676
- Cymeryng, C., Cazzulo, J. J. und Cannata, J. J. B. (1995). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and physicochemical and kinetic properties. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**: 91-1001
- Davies, D. D. (1986). The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum* **67**: 702-706
- Descolas-Gros, C. und Oriol, L. (1992) Variations in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. Beta-carboxylation in carbon flux studies. *Marine Ecology Progress Series* **85**: 163-169
- Dionisio, M. L., Tsusuki, M. und Miyachi, S. (1989). Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* **30**: 215-219
- Dittrich, P., Campbell, W. H. und Black, C. C. (1973). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology* **52**: 357-361
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. und Mattick, J. S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**: 4008
- Drechsler, Z. und Beer, S. (1991). Utilization of inorganic carbon by *Ulva lactuca*. *Plant Physiology* **97**: 1439-1444



- Drincovich, M. F., Casati, P. und Andreo, C. S. (2001). NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**: 1-6
- Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Donahue, R. und Edwards, G. (1998). UV-B induction of NADP-malic enzyme in etiolated and green maize seedlings. *Plant, Cell and Environment* **21**: 63-70
- Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Franceschi, V., Edwards, G. E. und Ku, M. S. B. (1998). Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Flaveria* species: isoforms of NADP-malic enzyme. *Plant Physiology* **117**: 733-744
- Drincovich, M. F., Iglesias, A. A. und Andreo, C. S. (1991). Interaction of divalent metal ions with the NADP-malic enzyme from maize leaves. *Physiologia Plantarum* **81**: 462-466
- Dring, M. J. (1989). Stimulation of light-saturated photosynthesis in *Laminaria* (Phaeophyta) by blue light. *Journal of Phycology* **25**: 254-257
- Dunten, P., Belunis, C., Crowther, R., Hollfelder, K., Kammlott, U., Levin, W., Michel, H., Ramsey, G. B., Swain, A., Weber, D. und Wertheimer, S. J. (2002). Crystal structure of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase reveals a new GTP-binding site. *Journal of Molecular Biology* **316**: 257-264
- Edwards, G. E. und Andreo, C. S. (1992). NADP malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**: 1845-1857
- Edwards, G. E. und Huber, S. C. (1981). The C<sub>4</sub> pathway. In: 'The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise' (Hatch, M. D. und Boardman, N. K.) 8: 237-281. Academic Press, New York.
- Edwards, G. E. und Walker, D. A. (1983). C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: mechanisms and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific, Oxford
- Edwards, G. E., Franceschi, V. R., Ku, M. S. B., Voznesenskaya, E. V., Pyankov, V. I. und Andreo, C. S. (2001). Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C<sub>4</sub> plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 577-590
- Evans, L. V. (1966). Distribution of pyrenoids among some brown algae. *Journal of Cell Science* **1**: 449-454
- Evans, L. V. und Holligan, M. S. (1972). Correlated light and electron microscope studies on brown algae. II. Physode production in *Dictyota*. *New Phytologist* **71**: 1173-1180
- Falkowski, P. G. und Raven, J. A. (1997). 'Aquatic photosynthesis': 128-163. Blackwell Science, London
- Famiani, F., Walker, R. P., Técsi, L., Chen, Z.-H., Proietti, P. und Leegood, R. C. (2000). An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany* **51**: 675-683
- Fathi, M. und Schnarrenberger, C. (1990). Purification by immunoabsorption and immunochemical properties of NADP-dependent malic enzymes from leaves of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology* **92**: 710-717
- Ferreira, M. L. F., Andreo, C. S. und Podestá, F. E. (2003). Purification and physical and kinetic characterization of a photosynthetic NADP-dependent malic enzyme from CAM plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Science* **164**: 95-102

- Fielding, A. S., Turpin, D. H., Guy, R. D., Calvert, S. E., Crawford, D. W. und Harrison, P. J. (1998). Influence of the carbon concentrating mechanism on carbon stable isotope discrimination by the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1098-1103
- Finnegan, P. M. und Burnell, J. N. (1995). Isolation and sequence analysis of cDNA encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from the PCK-type C<sub>4</sub> grass *Urochloa panicoides*. *Plant Molecular Biology* **27**: 365-376
- Flügge, U. I., Freisl, M., Heldt, H. W. (1980). The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. *Planta* **149**: 48-51
- Forster, R. M. und Dring, M. J. (1992). Interactions of blue light and inorganic carbon supply in the control of light-saturated photosynthesis in brown algae. *Plant, Cell and Environment* **15**: 241-247
- Forster, R. M. und Dring, M. J. (1994). Effects of blue light on the photosynthetic capacity of marine plants from different taxonomic ecological and morphological groups. *European Journal of Phycology* **29**: 21-27
- Franci, C. und Vidal, C. (1988). Coupling redox and enzymic reactions improves the sensitivity of the ELISA-spot assay. *Journal of Immunological Methods* **107**: 239-244
- Frenkel, R. (1975). Regulation and physiological functions of malic enzymes. *Current Topics in Cellular Regulation* **9**: 157-181
- Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **85**: 8998-9002
- Fukuzawa, H., Miura, K., Ishizaki, K., Kucho, K., Saito, T., Kohinata, T. und Ohyama, K. (2001). Ccm1, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO<sub>2</sub> availability. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **98**: 5347-5352
- Furumoto, T., Hata, S. und Izui, K. (1999). cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell specific enzyme. *Plant Molecular Biology* **41**: 301-311
- Garrido-Pertierra, A., Martinez Marcos, C., Martin Fernandes, M. und Ruiz-Amil, M. (1983). Properties and function of malate enzyme from *Pseudomonas putida*. *Biochimie* **65**: 629-635
- Giordano, M. und Marberly, S.C. (1989). Distribution of carbonic anhydrase in british marine macroalgae. *Oecologia* **81**: 534-539
- Giráldez, N., Aparicio, P. J. und Quiñones, M. A. (1998). Blue light requirement for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake and its action spectrum in *Monoraphidium braunii*. *Photochemistry and Photobiology* **68**: 420-426
- Goldie, H. und Sanwal, B. D. (1980). Allosteric control by calcium and mechanism of desensitization of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **255**: 1399-1405
- Gonen, Y., Kimmel, M. und Friedlander, M. (1995). Diffusion boundary layer transport in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **31**: 768-773
- Goodridge, A. G., Klautky, S. A., Fantozzi, D. A., Baillie, R. A., Hodnett, D. W., Chen, W., Thurmond, D. C., Xu, G. und Roncero, C. (1996). Nutritional and hormonal regulation of expression of the gene for malic enzyme. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **52**: 89-122

- Granbom, M. und Pedersén, M. (1999). Carbon acquisition of the red alga *Eucheuma denticulatum*. *Hydrobiologia* **398/399**: 349-354
- Grolig, F. und Wagner, G. (1987). Vital staining permits isolation of calcium vesicles from the green alga *Mougeotia*. *Planta* **171**: 433-437
- Grolig, F., Williamson, E., Parke, J., Miller, C. und Anderton, B. (1988). Myosin and  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive streaming in the alga *Chara*: detection of two polypeptides reacting with a monoclonal anti-myosin and their localization in the streaming endoplasm. *European Journal of Cell Biology* **47**: 22-31
- Groß, U., Gilles, F., Bender, L., Berghöfer, P. und Neumann, K.-H. (1993). The influence of sucrose and elevated  $\text{CO}_2$  concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**: 143-150
- Gutknecht, J., Bisson, M. A. und Tosteson, F.C. (1977). Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. Effect of carbonic anhydrase, bicarbonate and unstirred layers. *Journal of Experimental Biology* **41**: 1385-1391
- Haglund, K., Björk, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina G und Pedersén, M. (1992). Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* **187**: 275-281
- Hanson, R. W. und Patel, Y. M. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): the gene and the enzyme. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **69**: 203-281
- Hanson, R. W. und Resthef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 581-611
- Hanson, D., Andrews, T. J. und Badger, M. R. (2002). Variability of the pyrenoid-based  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism in hornworts (Anthocerotophyta). *Functional Plant Biology* **29**: 407-416
- Harlocker, S. L., Kapper, M. A., Greenwalt, D. E. und Bishop, S. H. (1991). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from ribbed mussel gill tissue: reactivity with metal ions, kinetics and action of 3-mercaptopicolinic acid. *Journal of Experimental Zoology* **257**: 285-298
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), New York
- Hatch, M. D. (1987).  $\text{C}_4$  photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta* **895**: 81-106
- Hillrichs, S. und Schmid, R. (2001): Activation by blue light of inorganic carbon acquisition for photosynthesis in *Ectocarpus siliculosus*: organic acid pools and short-term fixation. *European Journal of Phycology* **36**: 71-79
- Holbrook, G. P., Beer, S., Spencer, W. E., Reiskind, J. B., Davis, J. S. und Bowes, G. (1988). Photosynthesis in marine macroalgae: evidence for carbon limitation. *Canadian Journal of Botany* **66**: 577-582
- Holdsworth, E. S. und Bruck, K. (1977). Enzymes concerned with beta-carboxylation in marine phytoplankter. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Archives of Biochemical and Biophysics* **182**: 87-94
- Holdsworth, E. S. und Colbeck, J. (1976). The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology* **38**: 189-199

- Honda, H., Akagi, H. und Shimada, H. (2000). An isozyme of the NADP-malic enzyme of a CAM plant, *Aloe arborescens*, with variation on conservative amino acid residues. *Gene* **243**: 85-92
- Hsu, R. Y., Mildvan, A. S., Chang, G.-G. und Fung, C.-H. (1976). Mechanism of malic enzyme from pigeon liver. Magnetic resonance and kinetic studies of the role of  $Mn^{2+}$ . *Journal of Biological Chemistry* **251**: 6574-6583
- Hu, G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of non-templated extra nucleotides to 3' end of a DNA fragment. *DNA and Cell Biology* **12**: 763-770
- Hunt, M. und Köhler, P. (1995). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1249**: 15-22
- Iglesias, A. A. und Andreo, C. S. (1990). Kinetic and structural properties of NADP-malic enzyme from sugarcane leaves. *Plant Physiology* **92**: 66-72
- Innis, M.A. (1988). DNA Sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **85**: 9436-9440
- Israel, A., Beer, S. und Bowes, G. (1991). Photosynthetic carbon acquisition in the red alga *Gracilaria conferta*. I. Gas-exchange properties and the fixation pathway. *Marine Biology* **110**: 195-198
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 403-405
- Jenks, A. und Gibbs, S. P. (2000). Immunolocalization and distribution of form II Rubisco in the pyrenoid and chloroplast stroma of *Amphidinium carterae* and form I Rubisco in the symbiont-derived plastids of *Peridinium foliaceum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* **36**, 127-138
- Jensen, R. G. und Bahr, J. T. (1977). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 379-400
- Johnston, A. M. (1991). The acquisition of inorganic carbon by marine macroalgae. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1123-1132
- Johnston, J. D. und Noguera Aranjó, G. de C. (1980). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *Journal of Immunological Methods* **43**: 349-350
- Johnston, A. M. und Raven, J. A. (1986). The analysis of photosynthesis in air and water of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Oecologia* **69**: 288-295
- Johnston, A. M. und Raven, J. A. (1987). The C<sub>4</sub>-like characteristics of the intertidal macroalga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia* **26**: 159-166
- Johnston, A. M. und Raven, J. A. (1989). Extraction, partial purification and characterisation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **25**: 568-576
- Johnston, A. M. und Raven, J. A. (1996). Inorganic carbon accumulation by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Phycology* **31**: 285-290
- Johnston, A. M.; Raven, J. A., Beardall, J. und Leegood, R. C. (2001). Photosynthesis in a marine diatom. *Nature* **412**: 40-41

- Jolliffe, P. A. und Tregunna, E. B. (1970). Studies on  $\text{HCO}_3^-$  ion uptake during photosynthesis in benthic marine algae. *Phycologia* **9**: 293-303
- Jordan, P. und Vilter, H. (1991). Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1073**: 98-106
- Joshi, G. V., Karekar, M. D., Gowda, C. A. und Bhosale, L. (1974)). Photosynthetic carbon metabolism and carboxylation enzymes in algae and mangrove under saline conditions. *Photosynthetica* **8**: 51-52
- Kampfenkel, K. (1992). Limited proteolysis of NADP-malate dehydrogenase from pea chloroplast by aminopeptidase K yields monomers: Evidence of proteolytic degradation of NADP-malate dehydrogenase during purification from pea. *Biochimica et Biophysica Acta* **1156**: 71-77
- Kaplan, A. und Reinhold, L. (1999).  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 539-570
- Kaplan, A., Ronen-Tarazi, M., Zer, H., Schwarz, R., Tchernov, D., Boneh, D. J., Schatz, D., Vardi, A., Hassidim, M. und Reinhold, L. (1998). The inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria: induction and ecological significance. *Canadian Journal of Botany* **76**: 917-924
- Katsaros, C., Kreimer, G. und Melkonian, M. (1991). Localization of tubulin and a centrin-homologue in vegetative cells and developing gametangia of *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb. (Phaeophyceae, Ectocarpales). *Botanica Acta* **104**: 87-92
- Kawamitsu, Y. und Boyer, J. S. (1999). Photosynthesis and carbon storage between tides in a brown alga, *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* **133**: 361-369
- Keen, J. N., Evans, L. V. und Callow, J. A. (1988). Extraction of enzymes from marine macroalgae. In: 'Phycocolloids and Fine chemicals': 227-253. COST 48 Marine Primary Biomass, CEC, Brussels
- Kerby, N. W. und Evans, L. V. (1978). Isolation and partial characterization of pyrenoids from the brown alga *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm.. *Planta* **142**, 91-95
- Kerby, N. W. und Evans, L. V (1981). Pyrenoid protein from the brown alga *Pilayella littoralis*. *Planta* **151**: 469-475
- Kerby, N. W. und Evans, L. V.(1983a). Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **19**: 1-3
- Kerby, N. W. und Evans, L. V. (1983b). Properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **19**: 421-424
- Kerby, N. W. und Raven, J. A. (1985). Transport and fixation of inorganic carbon by marine algae. *Advances in Botanical Research* **11**: 71-123
- Kim, D.-J. und Smith, S. M. (1994) Molecular cloning of cucumber phosphoenolpyruvate carboxykinase and developmental regulation of gene expression. *Plant Molecular Biology* **26**: 423-434
- Kleczkowski, L., Volland, P., Luthi, E. und Preiss, J. (1993). Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiology* **101**: 179-186
- Knox, R. B. (1982). Methods for locating and identifying antigens in plant tissues. In: 'Techniques in immunocytochemistry'. Band 1 (G. R. Bullock and P. Petrusz ): 205-238. Academic Press, London

- Koch, M., Glombitza, K. W. und Eckhard, G. (1980). Phlorotannins of Phaeophyceae *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry* **19**: 1821-1823
- Kozak, M. (1984). Compilation of the sequences upstream from the translation start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **12**: 857-872
- Kremer, B.P. (1981a). Aspects of carbon metabolism in marine macroalgae. *Oceanography Marine Biology Annual Review* **19**: 41-94
- Kremer, B. P. (1981b). Metabolic implications of non-photosynthetic carbon fixation in brown algae. *Phycologia* **20**: 242-250
- Kremer, B. P. (1984). Carbohydrate reserve and dark carbon fixation in the brown macroalga, *Laminaria hyperborea*. *Journal of Plant Physiology* **117**: 233-242
- Kremer, B. P. und Küppers, U. (1977). Carboxylating enzymes and pathways of photosynthetic carbon assimilation in different marine algae - evidence for C<sub>4</sub> pathway? *Planta* **133**: 191-196
- Kremer, B. P. und Willenbrink, J. (1972). CO<sub>2</sub>-Fixierung und Stofftransport in benthischen marinen Algen. I. Zur Kinetik der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Assimilation bei *Laminaria saccharina*. *Planta* **103**: 55-64
- Ku, M. S. B., Spalding, M. M. und Edwards, G. E. (1980). Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in leaves of C<sub>4</sub> and CAM plants. *Plant Science Letters* **19**: 1-8
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M. und Miyachi, S. (1991). Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO<sub>2</sub> concentration in unicellular green algae. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1062-1069
- Kuo, C.-C., Tsai, L.-C., Chin, T.-Y., Chang, G.-G. und Chou, W.-Y. (2000). Lysine residues 162 and 340 are involved in the catalysis and coenzyme binding of NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme from pigeon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **270**: 821-825
- Küppers, U. und Kremer, B. P. (1978). Longitudinal profiles of carbon dioxide fixation capacities in marine macroalgae. *Plant Physiology* **62**: 49-53
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**: 203-209
- Lacoste-Royal, G. und Gibbs, S. P. (1987). Immunocytochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the pyrenoid and the thylakoid region of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **83**: 602-606
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamed, R. und Zeikus, J. K. (1981). Thermostable, ammonium-activated malic-enzyme of *Clostridium thermocellum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **660**: 251-255
- Larsson, C. und Axelsson, L. (1999). Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *European Journal of Phycology* **34**: 79-86
- Larsson, C., Axelsson, L., Ryberg, H. und Beer, S. (1997). Photosynthetic carbon utilisation by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology* **32**: 71-104

- Lea, P. J., Chen, Z.-H., Leegood, R. C. und Walker, R. P. (2000). Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism? *Amino Acids* **20**: 225-241
- Lee, R. K. S. (1980). A catalogue of the marine algae of the canadian arctic. Ottawa: National Museums of Canada. *Publications in Botany* **9**: 82 ff
- Leegood, R. (2002). C<sub>4</sub> photosynthesis: principles of CO<sub>2</sub> concentration and prospects for its introduction into C<sub>3</sub> plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 581-590
- Leegood, R. C. und ap Rees, T. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cotyledones of *Cucurbita pepo*. *Biochimica et Biophysica Acta* **524**: 207-218
- Lin, S. und Carpenter, E. J. (1997). Rubisco of *Dunaliella tertiolecta* is redistributed between the pyrenoid and the stroma as a light/shade response. *Marine Biology* **127**: 521-529
- Lin, R. C. und Davis, E. J. (1974). Malic enzymes of rabbit heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 3867-3875
- Linss, J., Goldenberg, S., Urbina, J. A. und Amzel, L.M. (1993). Cloning and characterization of the gene encoding ATP-dependent phospho-enol-pyruvate carboxykinase in *Trypanosoma cruzi*: comparison of primary and predicted secondary structure with host GTP-dependent enzyme. *Gene* **136**: 69-77
- Loeber, G., Maurer-Fogy, I. und Schwendenwein, R. (1994b). Purification, cDNA cloning and heterologous expression of the mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. *Biochemical Journal* **304**: 687-692
- Loeber, G., Dworkin, M. B., Infante, A., Ahorn, H. (1994a). Characterization of cytosolic malic enzyme in human tumor cells. *FEBS Letters* **344**: 181-186
- London, J., Meyer, E. Y. und Kulczyk, S. R. (1971). Detection of relationships between *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus casei* by immunological studies with two forms of malic enzyme. *Journal of Bacteriology* **108**: 196-201
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Lüning, K. (1985). Meeresbotanik: Verbreitung, Ökophysiologie und Nutzung der marinen Makroalgen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York
- Lüttge, U. (1996). *Clusia*: plasticity and diversity in a genus of C<sub>3</sub>-CAM intermediate tropical trees. In: 'Crassulacean Acid Metabolism' (K. Winter und J. A. C. Smith): 47-73. Springer, Berlin
- Madsen, T. V. und Sand-Jensen, K. (1991). Photosynthetic carbon assimilation in aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* **41**: 5-40
- Makino, A., Mae, T. und Ohira, K. (1983). Purification of storage of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from rice leaves. *Plant and Cell Physiology* **24**: 1169-1173
- Marberly, S. C. (1992). Carbonate ions appear to neither inhibit nor stimulate use of bicarbonate ions in photosynthesis by *Ulva lactuca*. *Plant, Cell and Environment* **15**: 255-260
- Marchuck, D., Drum, M., Saulino, A und Collins, F. S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR Products. *Nucleic Acids Research* **19**: 1154

- Margulis, L. und Schwartz, K. V. (1998). Five Kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on earth. W. H. Freeman, New York
- Marsden, W. J. N., Callow, J. A. und Evans, L. V. (1981). A novel and comprehensive approach to the extraction of enzymes from brown algae and their separation by polyacrylamide gel electrophoresis. *Marine Biology Letters* **2**: 353-362
- Martin, F. H., Castro, M. M., Aboul-ela, F. und Tinoco, I. Jr. (1985). Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. *Nucleic Acids Research* **13**: 8927-8938
- Maurino, V. G., Drincovich, M. F. und Andreo, C. S. (1996). NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. *Biochemistry and Molecular Biology International* **38**: 239-250
- Maurino, V. G., Saigo, M., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F. (2001). Non-photosynthetic malic-enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Molecular Biology* **45**: 409-420
- Maurino, V. G., Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Edwards, G. E., Ku, M. S. B., Gupta, S. K. und Franceschi, V. R. (1997). NADP-malic enzyme: immunolocalization in different tissues of the C<sub>4</sub> plant maize and the C<sub>3</sub> plant wheat. *Journal of Experimental Botany* **48**: 799-811
- Matte, A., Goldie, A. H., Sweet, R. M. und Delbaere, L. T. J. (1996). Crystal structure of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase: a new structural family with the P-loop nucleoside triphosphate hydrolase fold. *Journal of Molecular Biology* **256**: 126-143
- Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H. und Delbaere, L. T. J. (1997). Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 8105-8108
- Matz, M., Lukyanov, S., Bogdanova, E., Diatchenko, L. und Chenchik, A. (1999). Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Research* **27**: 1558-1560
- McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, Y. M. und Hanson, R. W. (1992). Metabolic control of gene expression: in vivo studies with transgenic mice. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 40-44
- McKay, R. M. L. und Gibbs, S. P. (1989). Immunocytochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase in light-limited and light saturated cells of *Chlorella pyrenoidosa*. *Protoplasma* **149**: 31-37
- McKay, R. M. L. und Gibbs, S. P. (1991). Composition and function of pyrenoids: cytochemical and immunocytochemical approaches. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1040-1052
- McKay, R. M. L., Gibbs, S. P. und Vaughn, K. C. (1991). Rubisco activase is present in the pyrenoid of green algae. *Protoplasma* **162**: 38-45
- Mercado, J. M. und Niell, F. X. (1999). Carbonic anhydrase activity and use of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in *Bostrychia scorpioides* (Ceramiales, Rhodophyceae). *European Journal of Phycology* **34**: 13-19
- Morita, E., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. und Nozaki, H. (1997). High localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy. *Journal of Phycology* **33**: 68-72
- Morita, E., Abe, T., Tsuzuki, M., Fujiware, S., Sato, N., Hirata, A., Sonoike, K. und Nozaki, H. (1998). Presence of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free-living algal genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyta). *Planta* **204**: 269-276



- Morita, E., Abe, T., Tsuzuki, M., Fujiware, S., Sato, N., Hirata, A., Sonoike, K. und Nozaki, H. (1999). Role of pyrenoids in the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism: comparative morphology physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). *Planta* **208**: 365-372
- Moroney, J. V. und Chen, Z.-Y. (1998). The role of the chloroplast in inorganic carbon uptake by eukaryotic algae. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1025-1034
- Moroney, J. V. und Somanchi, A. (1999). How do microalgae concentrate CO<sub>2</sub> to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiology* **119**: 9-16
- Moroney, J. V., Husic, H. D. und Tolbert, N.E. (1985). Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **79**: 177-183
- Mozdzynowski, J., Hembach, P. und Speicher, D. W. (1992). High yield elektroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **13**: 59-64
- Müller, D.G. (1979). Genetic affinity of *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngb. from the Mediterranean, North Atlantic and Australia. *Phycologia* **18**: 312-318
- Nevaldine, B. H., Bassel, A. R. und Hsu, R. Y. (1974). Mechanism of pigeon liver malic enzyme subunit structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **336**: 283-293
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. Jr., Deerfield, D. W. II (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* **4**: 14
- Ochoa, S., Mehler, A. und Kornberg, A. (1947). Reversible oxidative decarboxylation of malic acid. *Journal of Biological Chemistry* **167**: 871-872
- Okada, M. (1992). Recent studies on the composition and the activity of algal pyrenoids. In: 'Progress in phycological research' (Round, F. E. und Chapman, D. J.) **8**: 117-138. Biopress, Bristol
- Orús, M. J., Rodriguez, M. L., Martinez, F. und Marco, E. (1995). Biogenesis and ultrastructure of carboxysomes from wild type and mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Plant Physiology* **107**: 1159-1166
- Osafune, T., Yokota, A., Sumida, S. und Hase, E. (1990). Immunogold localization of rubisco-1,5-bisphosphate carboxylase with reference to pyrenoid morphology in chloroplasts of synchronized *Euglena gracilis* cells. *Plant Physiology* **92**: 802-808
- Osafune, T., Tsuyama, K., Hase, E., Ehara, T. und Kiyota, M. (1997). Correlation between the pyrenoid morphology and Rubisco in chloroplast of synchronized *Chlamydomonas* cells. *Phycologia* **36**: 81 S.
- Pearson, G., Serrão, E. A. und Cancela, M. L. (2001). Suppression subtractive hybridization for studying gene expression during aerial exposure and desiccation in fucoid algae. *European Journal of Phycology* **36**: 359-366
- Petersen, S., Mack, C., de Graaf, A. A., Riedel, C., Eikmans, B. J. und Sahm, H. (2001). Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo. *Metabolic Engineering* **3**: 344-361
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*: **38**, 346-356

- Pinto, M. E., Casati, P., Hsu, T.-P., Ku, M. S. P. und Edwards, G. E. (1999). Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **48**: 200-209
- Price, G. D., Stültemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M. und Badger, M. R. (1998). The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian Journal of Botany* **76**: 973-1002
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: 'Cultures and Collection of Algae' (Watanabe, A. und Hattori, A.): 63-75. Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo.
- Pupillo, P. und Bossi, P. (1979). Two forms of NADP-dependent malic enzyme in expanding maize leaves. *Planta* **144**: 283-289
- Quiquampoix, H., Lougham, B. und Ratcliff, R. G. (1993). A <sup>31</sup>P-NMR study of the uptake and compartmentation of manganese by maize roots. *Journal of Experimental Botany* **44**: 1819-1827
- Raven, J. A. (1970). Exogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **45**: 167-221
- Raven, J. A. (1997a). Inorganic carbon acquisition in marine autotrophs. *Advances in Botanical Research* **27**: 85-209
- Raven, J. A. (1997b). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms: a direct role for thylakoid lumen acidification? *Plant, Cell and Environment* **20**: 147-154
- Raven, J. A. (1997c). The role of marine biota in the evolution of terrestrial biota: gases and genes. *Biogeochemistry* **39**: 139-164
- Raven, J. A. (1997d). Putting the C in phycology. *European Journal of Phycology* **32**: 319-333
- Raven, J. A. (1997e). Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. *Advances in Botanical Research* **27**: 85-209
- Raven, J. A., Osborne, B. A. und Johnston, A. M. (1985). Uptake of CO<sub>2</sub> by aquatic vegetation. *Plant, Cell and Environment* **8**: 417-425
- Rawat, M., Henk, M. C., Lavigne, L. L. und Moroney, J. V. (1996). *Chlamydomonas reinhardtii* mutants without ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase lack a detectable pyrenoid. *Planta* **198**: 263-270
- Reinfelder, J. R., Kraepiel, A. M. L. und Morel, M. M. (2000). Unicellular C<sub>4</sub> photosynthesis in a marine diatom. *Nature* **407**: 996-999
- Reiskind, J. B., Seamon, P.T. und Bowes, G. (1988). Alternative methods of photosynthetic carbon assimilation in marine macroalgae. *Plant Physiology* **87**: 686-692
- Reiskind, J. B. und Bowes, G. (1991). The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in marine macroalga with C<sub>4</sub>-like photosynthetic characteristics. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 2883-2887
- Reiskind, J. B. und Bowes, G. (1995). Immunogold localisation of PEPCK in a C<sub>4</sub>-like alga. *Plant Physiology* **108**: 89 S.

- Reiskind, J. B., Seamon, P. T. und Bowes, G. (1988). Alternative methods of photosynthetic carbon assimilation in marine macroalgae. *Plant Physiology* **87**: 686-692
- Reiskind, J. B., Seamon, P. T. und Bowes, G. (1989). Photosynthetic responses and anatomical features of two marine makroalgae with different CO<sub>2</sub> compensation points. *Aquatic Botany* **33**: 71-86
- Reymond, P., Geourjon, C., Roux, B., Durand, R. und Fevre, M. (1992). Sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase - encoding cDNA from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: comparison of the amino acid sequence with animals and yeast. *Gene* **110**: 57-63
- Riebesell, U. (2000). Carbonfix for a diatom. *Nature* **407**: 959-960
- Riebesell, U., Wolf-Gladrow, D. A. und Smetacek, V. (1993). Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates. *Nature* **361**: 249-251
- Rothermel, B. A. und Nelson, T. (1989). Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 19587-19592
- Roux, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods and Applications* **4**: 5185-5194
- Ruiz-Hidalgo, M. J., Benito, E. P., Sandmann, G. und Eslava, A. P. (1997). The phytone dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by light and vitamin A. *Molecular and General Genetics* **253**: 734-744
- Russel, G. (1966). The genus *Ectocarpus* in Britain. I. The attached forms. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **46**: 267-294
- Saitou, K., Agata, W., Asakura, M. und Kubota, F. (1992). Structural and kinetic properties of NADP-malic enzyme from the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.. *Plant and Cell Physiology* **33**: 595-600
- Saitou, K., Agata, W., Masui, Y., Asakura, M. und Kubota, F. (1994). Isoforms of NADP-malic enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. that are involved in C<sub>3</sub> photosynthesis and crassulacean acid metabolism. *Plant and Cell Physiology* **35**: 1165-1171
- Sand-Jensen, K. und Gordon, D. M. (1984). Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2</sub>. *Marine Biology* **80**: 247-253
- Sand-Jensen, K., Revsbech, N. P. und Jørgensen, B. B. (1985). Microprofiles of oxygenin epiphyte communities on submerged macrophytes. *Marine Biology* **80**: 247-253
- Sage, R. F. (2001). Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C<sub>4</sub> photosynthetic syndrome. *Plant Biology* **3**: 202-213
- Sage, R. F. und Monson, R. K. (1999). C<sub>4</sub> Plant Biology 596 (Academic, San Diego)
- Sakano, K. (1998). Revision of biochemical pH-stat: involvement of alternative pathway metabolisms. *Plant and Cell Physiology* **39**: 467-473
- Sakano, K. (2001). Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defence reaction and secondary metabolism. *International Journal of Cytology* **206**: 1-44
- Salinowich, O. und Montelato, R. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry* **156**: 341-347

- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T. und Wüthrich, K. (1997). Metabolic fluxes in riboflavin producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnology* **15**: 448-452
- Sauer, U., Lasko, D. R., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wüthrich, K. und Bailey, J. E. (1999). Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Journal of Bacteriology* **181**: 6679-6688
- Schaaf, J., Walter, M. H. und Hess, D. (1995). Primary metabolism in plant defense-regulation of bean malic enzyme gene promoter in transgenic tobacco by developmental and environmental cues. *Plant Physiology* **108**: 949-960
- Schopf, J. W., Kudryavtsev, A. B., Agresti, D. G., Wdowiak, T. J. und Czaja, A. D. (2002). Laser-Raman imaging of earth's earliest fossils. *Nature* **416**: 73-76
- Schmid, R. (1998). Photosynthesis of *Ectocarpus siliculosus* in red light and after pulses of blue light at high pH-evidence for bicarbonate uptake. *Plant, Cell and Environment* **21**: 523-529
- Schmid, R. und Dring, M. J. (1992). Circadian rhythm and fast response to blue light of photosynthesis in *Ectocarpus* (Phaeophyta, Ectocarpales). I. Charakterization of the rhythm and the blue light response. *Planta* **187**: 53 – 59
- Schmid, R. und Dring, M. J. (1993a). Evidence for two different blue-light-receptor systems for the fast responses of stimulation of photosynthetic capacity and acidification of the plant surface in brown algae. *Planta* **191**: 489-495
- Schmid, R. und Dring, M. J. (1993b). Evidence for the fast responses of stimulation of photosynthetic capacity and acidification of the plant surface in brown algae. *Planta* **191**: 489-495
- Schmid, R. und Dring, M. J. (1996a). Influence of carbon supply on the circadian rhythmicity of photosynthesis and its stimulation by blue light in *Ectocarpus siliculosus*: clues to the mechanism of inorganic carbon acquisition in lower brown algae. *Plant, Cell and Environment* **19**: 373-382
- Schmid, R. und Dring, M. J. (1996b). Blue light and carbon acquisition in brown algae: an overview and recent developments. *Scientia Marina* **60**: 115-124
- Schmid, R. und Hillrichs, S. (2001). Uptake and accumulation of inorganic carbon in *Ectocarpus siliculosus* and its relation to blue light stimulation of photosynthesis. *European Journal of Phycology* **36**: 257-264
- Schmid, R., Dring, M.J. und Forster, R.M. (1994). Kinetics of blue-light stimulation and circadian rhythmicity of light-saturated photosynthesis in brown algae: a species comparison. *Journal of Phycology* **30**: 612-621
- Schmid, R., Mills, J. A. und Dring, M. J. (1996). Influence of carbon supply on the stimulation of light-saturated photosynthesis by blue light in *Laminaria saccharina*: implications for the mechanism of carbon acquisition in higher brown algae. *Plant, Cell and Environment* **19**: 383-391
- Schwarz, R., Reinhold, L. und Kaplan, A. (1995). Low activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in carboxysome-defective *Synechococcus* mutants. *Plant Physiology* **108**: 183-190
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 32678-32684
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. und Lukyanov, S. A. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **23**: 1087-1088

- Smith, R. G., Gauthier, D. A., Dennis, D. T. und Turpin, D. H. (1992). Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology* **98**: 1233-1238
- Snoeijs, M., Klenell, M., Choo, K. S., Comhaire, I., Ray, S. und Petersén, M. (2002). *Marine Biology* **140**: 435-444
- Spalding, M. H. (1998). CO<sub>2</sub> acquisition: acclimation to changing carbon availability. In: 'The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*' (Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. und Merchant, S.): 529-547. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Spalding, M. H. und Portis, A. R. (1985). A model of carbon dioxide assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **164**: 308-320
- Spina, J., Bright, H. und Rosenbloom, J. (1970). Purification and properties of L-malic enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **9**: 3794-3801
- Summons, R. E., Jahnke, L. L., Hope, J. M. und Logan, G. A. (1999). 2-Methylhaponoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**: 554-557
- Surif, M. B. und Raven, J. A. (1989). Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia* **82**: 68-80
- Süss, K.-H., Prokhorenko, J. und Adler, K. (1995). In situ association of Calvin cycle enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, and nitrate reductase with thylacoid chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy. *Plant Physiology* **107**: 1387-1397
- Swierczynski, J. (1980). Purification and some properties of extramitochondrial malic enzyme from rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* **616**: 10-21
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680
- Thoms, S., Pahlow, M. und Wolf-Gladrow, D. A. (2001). Model of carbon concentrating mechanism in chloroplasts of eucaryotic algae. *Journal of Theoretical Biology* **208**: 295-313
- Tortora, P., Hanozet, G. M. und Gueritore, A. (1985). Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its use for bicarbonate assay. *Analytical Biochemistry* **144**: 179-185
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1997). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* **76**: 4350-4354
- Trapani, S., Linss, J., Goldenberg, S., Fischer, H., Craievich, A. F. und Oliva, G. (2001). Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **313**: 1059-1072
- Usada, H. und Shimogawara, K. (1994). Induction of the inactivation and degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in maize leaves by freezing and thawing. *Plant and Cell Physiology* **35**: 363-370

- Utter, M. F. und Kolenbrander, H. M. (1972). Formation of oxalacetat by CO<sub>2</sub> fixation on phosphoenolpyruvate. In: 'The Enzymes' (Boyer, P. D.) 6: 117-168, Academic Press, New York
- Wingler, A., Walker, R. P., Chen, Z.-H. und Leegood, R. C. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiology* **120**: 539-545
- Walker, R. P. und Chen, Z.-H. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase: Structure, function and regulation. *Advances in Botanical Research* **38**: 93- 189
- Walker R. P. und Leegood, R. C. (1995). Purification and phosphorylation in vivo and in vitro of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Letters* **362**: 70-74
- Walker, R. P., und Leegood, R. C. (1996). Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. Studies in plants with C<sub>4</sub> photosynthesis and crassulacean acid metabolism and in germinating seeds. *Biochemical Journal* **317**: 653-658
- Walker, R. P., Trevanion, S. J. und Leegood, R. C. (1995). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from higher plants: purification from cucumber and evidence of rapid proteolytic cleavage in extracts from a range of plant tissue. *Planta* **196**: 58-63
- Walker, R. P., Acheson, R. M., Técsi, L. I. und Leegood, R. C. (1997). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in C<sub>4</sub> plants: its role and regulation. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**: 459-468
- Walker, R. P., Chen, Z.-H., Acheson, R. M. und Leegood, R. C. (2002). Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C<sub>4</sub> plant, guinea grass. *Plant Physiology* **128**: 165-172
- Walker, R. P., Chen, Z.-H., Johnston, K. E., Famiani, F., Técsi, L. und Leegood, R. C. (2001). Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the examples of its use in the localisation of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in the pH regulation. *Journal of Experimental Botany* **52**: 565-576
- Walker, R. P., Chen, Z.-H., Técsi, L. I., Famiani, F., Lea, P. J. und Leegood, R. C. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* **210**: 9-18
- Wedding, R. T. (1989). Malic enzymes of higher plants: Characteristics, regulation and physiological function. *Plant Physiology* **90**: 367-371
- Weidner, M. und Küppers, U. (1973). Phosphoenolpyruvate carboxykinase und Ribulose-1,5-diphosphate-carboxylase von *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Fosl.: das Verteilungsmuster der Enzymaktivität im Thallus. *Planta* **114**: 364-372
- Weidner, M. und Küppers, U. (1982). Metabolic conversion of <sup>14</sup>C-aspartate, <sup>14</sup>C-malate and <sup>14</sup>C-mannitol by tissue discs of *Laminaria hyperborea*: role of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **108**: 353-363
- Weissensteiner, T. und Lanchbury, J. S. (1996). Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *BioTechniques* **21**: 1102-1108
- Werdan, K., Heldt, H. W. und Milovancev, M. (1975). The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO<sub>2</sub> fixation in the light and dark. *Biochimica et Biophysica Acta* **396**: 276-292

- Wiley, J. (1995). Electrophoretic transfer of proteins for sequence analysis. *Current Protocols in Protein Science*, New York
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**: 474-481
- Wilson, G. H., Grolig, F. und Kosegarten, H. (1998). Differential pH restoration after ammonia-elicited vacuolar alkalinisation in rice and maize root hairs as measured by fluorescence ratio. *Planta* **206**: 154-161
- Wingler, A., Walker, R. P., Chen, Z.-H. und Leegood, R. C. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiology* **120**: 539-545
- Winter, K., Foster, J. G., Edwards, G. E. und Holtum, J. A. M. (1982). Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C<sub>3</sub> photosynthetic characteristics or exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology* **69**: 300-309
- Wynn, J. P., Kendrick, A., Hamid, A. A. und Ratledge, C. (1997). Malic enzyme: a lipogenic enzyme in fungi. *Biochemical Society Transactions* **25**: 669
- Wynn, J. P., Hamid, A. B. A. und Ratledge, C. (1999). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology-UK* **145**: 1911-1917
- Xu, Y., Bhargava, G., Wu, H., Loeber, G. und Tong, L. (1999). Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure* **7**: 877-889
- Yang, Z., Floyd, D. L., Loeber, G. und Tong, L. (2000). Structure of a closed form of human malic enzyme and implications for catalytic mechanism. *Nature Structural Biology* **7**: 251-257
- Zelewski, M. und Swierczynski, J. (1991). Malic enzyme in human liver: Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme. *European Journal of Biochemistry* **201**: 339-345

## Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Rainer Schmid, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte. Seine überaus engagierte Betreuung und zuverlässige Unterstützung, die mir auch nach seinem Ortswechsel nach Hamburg unverändert zugute kamen, haben diese Arbeit äußerst hilfreich begleitet. Seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft führten meist zur Lösung von Problemen, die sich selbst von "Schlauch und Spucke" unbeeindruckt zeigten.

In gleicher Weise gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. P. Galland für seine intensive Förderung meiner Arbeit und die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie zusätzlicher finanzieller und sonstiger Mittel. Auch danke ich für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie die immer gewährte wohlwollende Unterstützung.

Herrn Dr. Franz Grolig danke ich für zahlreiche wertvolle Ideen und Anregungen, insbesondere den zellbiologischen Aspekt dieser Arbeit betreffend. Desweiteren danke ich für die Einführung in die Benutzung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops sowie das sorgfältige Korrekturlesen der schriftlichen Arbeit.

Im Besonderen danke ich Siggie Völk, Agnes Debelius, Marco Göttig und Hilde Mengel für ihre unschätzbare Hilfe bei der Pflege der Algenkulturen, ihren unermüdlichen Einsatz beim kräftezehrenden feuchtfröhlichen Einlagern von Seewasser, ihren "aufreibenden" Einsatz bei den Enzymextraktionen und die unzähligen Tätigkeiten zur Aufrechterhaltung des Laborbetriebes.

Desweiteren gilt mein Dank:

Dr. Gareth Pearson (Faro, Portugal) für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise bezüglich der molekularbiologischen Techniken.

Dr. René Brunisholz (ETH-Zürich) für die schnelle Durchführung der Proteinsequenzierungen und sein bemerkenswertes Engagement hinsichtlich der Entschlüsselung problematischer Sequenzbereiche.



## Danksagung

---

Dr. Stefan Zauner (AG Maier) für die stets rasche Sequenzierung von DNA.

Den Mitgleidern der Arbeitsgruppe Batschauer für die freundliche Aufnahme im Labor während der Sanierungsarbeiten im Fachbereich, insbesondere auch Oxana Panajotowa für die Vermittlung fundierter Kenntnisse hinsichtlich TA-Klonierungstechniken und Markus Müller, der mir besonders in der Endphase dieser Arbeit bei Computer-Problemen half.

Allen Mitgleidern der Arbeitsgruppe Galland für das inspirierende und angenehme Arbeitsklima im Labor, insbesondere Silke Lehmann, mit der ich dieses unvergleichliche "Endspurt-Feeling" teilen durfte.

Besonders danke ich meinen Eltern sowie Ariane und Manon für ihren Rückhalt und ihre uneingeschränkte Unterstützung während allen Phasen dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

"Untersuchungen zur Rolle der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und des NADP<sup>+</sup>-Malat-Enzyms in der filamentösen Phaeophyceae *Ectocarpus siliculosus*"

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 23.07.2003

Sylvia Busch